

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

В. Ю. Ушаков, Л. Ю. Нестерова

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

*Допущено методическим советом
Пермского государственного национального
исследовательского университета в качестве
учебного пособия для студентов, обучающихся
по направлениям подготовки бакалавров
естественно-научных факультетов*



Пермь 2020

УДК 578: 579(075.8)

ББК 28.3+28.4

У932

Ушаков В. Ю.

У932 Микробиология и вирусология. Лабораторные работы по микробиологии : учебное пособие / В. Ю. Ушаков, Л. Ю. Нестерова ; Пермский государственный национальный исследовательский университет. – Пермь, 2020. – 104 с.

ISBN 978-5-7944-3548-1

Данное пособие содержит краткие сведения об объектах микробиологии, описание основных методов и приемов работы с микроорганизмами, а также изложение методов микроскопического анализа, принципов составления питательных сред и условий культивирования микроорганизмов и способов стерилизации.

Пособие составлено в виде серии лабораторных задач с сопутствующей теоретической частью, предлагаемых студентам для аудиторной и самостоятельной работы.

Цель издания – помочь студентам в приобретении навыков лабораторной работы с микроорганизмами.

Предназначено для студентов естественно-научных направлений.

УДК 578: 579(075.8)

ББК 28.3+28.4

*Печатается по решению ученого совета биологического факультета
Пермского государственного национального исследовательского университета*

Рецензенты: кафедра микробиологии и вирусологии Пермского государственного медицинского университета им. академика Е. А. Вагнера Министерства здравоохранения РФ (зав. кафедрой, д-р мед. Наук, профессор **Э. С. Горовиц**); профессор кафедры химии и биотехнологии ПНИПУ, д-р биол. наук **О. Н. Октябрьский**

© ПГНИУ, 2020

ISBN 978-5-7944-3548-1

© В. Ю. Ушаков, Л. Ю. Нестерова, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ.....	5
1.1. Питательные среды.....	6
1.2. Стерилизация питательных сред и оборудования.....	14
1.3. Подготовка микробиологической лаборатории к работе.....	16
1.4. Правила работы с культурами микроорганизмов.....	17
1.5. Приготовление реактивов.....	20
1.6. Методические инструкции к ведению лабораторных записей.....	23
1.7. Устройство микроскопа и правила работы с ним.....	24
ГЛАВА 2. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ.....	29
Занятие 1. Морфологическое разнообразие бактерий.....	29
Занятие 2. Клеточная стенка бактерий.....	36
Занятие 3. Движение бактерий.....	44
Занятие 4. Капсулы и слизистые чехлы.....	56
Занятие 5. Споры бактерий.....	59
Занятие 6. Запасные вещества и морфология дрожжей.....	62
Занятие 7. Определение антибиотикочувствительности микроорганизмов.....	68
Занятие 8. Определение способности бактерий к формированию биопленок.....	82
Занятие 9. Получение чистых культур и количественный учет микрофлоры воздуха.....	87
Занятие 10. Микрофлора воды и почвы.....	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	102

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время микробиология является одной из основных биологических дисциплин, без знания которой нельзя понять всего многообразия жизни на Земле, условий ее появления и эволюции. Поэтому роль микробиологии в подготовке специалистов-биологов весьма велика. Формирование эволюционного взгляда на жизнь, ее разнообразие и единство невозможно без тех сведений, которые даст современная наука о мире микробов.

Микробиология играет важную роль в разработке способов рационального использования биохимической активности микроорганизмов для повышения плодородия почв, добычи полезных ископаемых, восполнения энергетических ресурсов и очистки окружающей среды от многих загрязняющих веществ. Возникновение и быстрое развитие биотехнологии, приобретающей все большее значение в хозяйственной деятельности человека, базируются, прежде всего, на использовании микроорганизмов как продуцентов множества полезных веществ. Вместе с тем остается необходимым изыскание эффективных способов борьбы с микроорганизмами, вызывающими заболевания человека, животных и растений, а также порчу продуктов.

Таким образом, круг проблем, требующих интенсивного, глубокого изучения свойств микроорганизмов, весьма широк.

Глава 1. ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ

Практические занятия должны быть тесно связаны с теоретическим курсом микробиологии. Здесь студенты закрепляют полученные теоретические знания, осваивают методы микробиологического исследования и правила работы с культурами микроорганизмов. Следует экономно расходовать реактивы и бережно относиться к лабораторному оборудованию. Необходимо соблюдать требования техники безопасности: при выполнении заданий работать в халате, соблюдать тишину, не принимать пищу. Для выполнения лабораторных работ необходимо иметь при себе цветные карандаши и тетрадь для записи. Каждый студент на протяжении всех занятий работает на постоянном месте, с одним и тем же микроскопом, имеющим порядковый номер и готовит препараты самостоятельно.

В целях правильного понимания основных задач практикума перед каждым занятием дается краткое объяснение общих положений по данной теме и подробное описание методик и приемов проведения наблюдений. Индивидуальная работа осуществляется преподавателем с каждым студентом по мере выполнения задания. Преподаватель следит за тем, как студенты выполняют задание, и в случае необходимости оказывает им помощь. Хорошо выполненные препараты рекомендуются для ознакомления всем студентам в качестве примера качественного выполнения работы. Для проверки усвоения студентами пройденного материала и закрепления навыков лабораторной работы проводится семинар, а на последнем практическом занятии им предоставляется возможность провести комплексный микроскопический анализ бактериальных культур, которые выделяются каждым студентом самостоятельно.

Для проведения практических занятий лаборант заранее готовит необходимый материал. Приборы, реактивы, инструменты на рабочем столе должны быть расставлены с учетом правил техники безопасности. После каждого занятия следует привести свое рабочее место в порядок, а отработанные препараты обязательно поместить в сосуд с дезинфицирующим раствором.

Целесообразно в конце занятия сообщать тему следующего практического занятия и указывать нужные литературные источники.

1.1. Питательные среды

Питательные вещества – это растворенные в воде соединения, необходимые микроорганизмам для построения клеточных структур и энергитических процессов.

По вкладу в построение клетки различают макро- и микроэлементы. К первым относят десять элементов, именуемых «биогенные»: углерод, кислород, водород, азот, сера, фосфор, железо магний, кальций, калий. Микроэлементы можно назвать «следовыми», они попадают с пылью, из лабораторной посуды, как примеси в составе макроэлементах. К ним относят кобальт, цинк, молибден, хром, натрий, селен и др.

Любая микробиологическая работа связана с приготовлением питательных сред, которые необходимы для выделения, накопления и сохранения микроорганизмов, а также для выращивания культур с целью изучения их обмена веществ или получения ценных продуктов метаболизма. Среда должна включать все компоненты, необходимые для конструктивных и энергитических процессов клетки, которые крайне разнообразны, поэтому столь же разнообразны и потребности микроорганизмов в питательных веществах. Разнообразие сред проявляется, прежде всего, в отношении микроорганизмов к источнику углерода, что определяет специфику сред и позволяет разделить микроорганизмы на две большие группы – автотрофы и гетеротрофы.

Автотрофные микроорганизмы способны использовать в качестве единственного источника углерода CO_2 воздуха, тогда как потребности в углероде гетеротрофных микроорганизмов таким образом не могут быть удовлетворены. Для их развития среда должна содержать более восстановленные соединения углерода, которые в зависимости от физиолого-биохимических особенностей организма могут быть представлены различными органическими соединениями. При этом потребности некоторых микроорганизмов могут быть удовлетворены широким набором

органических веществ, тогда как другие характеризуются высокой специализацией и способностью использовать лишь немногие соединения углерода.

Неодинаковы требования микроорганизмов и к источнику азота. Для культивирования микроорганизмов, фиксирующих молекулярный азот (дiazотрофы), используют среды, не содержащие его соединений. В состав всех других сред входят различные азотсодержащие соединения. Это могут быть нитраты и соли аммония, аминокислоты или белки. Потребности значительного числа микроорганизмов в азоте могут быть удовлетворены нитратами. Однако в отличие от солей аммония в качестве источника азота они почти не употребляются, так как при использовании аниона в среде накапливаются катионы калия или натрия, которые токсичны для многих микроорганизмов. Для культивирования микроорганизмов, более требовательных к азоту и соответственно обладающих меньшими синтетическими способностями, питательные среды должны включать одну, несколько или полный набор аминокислот. Аминокислоты – цистин, цистеин, глутамин и аспарагин неустойчивы к нагреванию, поэтому их стерилизуют фильтрацией, остальные же аминокислоты можно стерилизовать в автоклаве при 0,5 атм в течение 15 мин. Для обеспечения микроорганизмов полным набором аминокислот и витаминами в среду добавляют гидролизат белка, для приготовления которого используют белки животного (мясо), растительного (семена сои) или микробного (дрожжи) происхождения. Гидролиз проводят с помощью протеолитических ферментов или кипячением с минеральными кислотами. Состав гидролизатов неодинаков и зависит от исходного субстрата, а также способа получения.

Кроме элементов минерального питания и источника углерода, микробам необходимы некоторые дополнительные вещества, именуемые факторами роста. Это вещества, которые входят в состав клетки, но не могут синтезироваться самим организмом. Это соединения, относящиеся к аминокислотам, пуринам, пиримидинам и витаминам. Организмы, требующие таких элементов роста извне, называются ауксотрофами *auxo* – вырастаю, выращиваю, *trophe* – пища, питание). Бактерии, способные синтезировать все необходимые вещества для роста и

развития – протрофами. Кроме того, особой формой специализации к элементам питания, можно выделить облигатных паразитов, зависящих от клетки-хозяина и имеющих редуцированные метаболические пути.

Итак, резюмируя, для построения прокариотической клетки требуются:

- 1) макроэлементы в следующей пропорции: C:2, H:7, O:1,5, N;
- 2) + P, S, Fe;
- 3) + щелочные металлы и их соли (Na, K, Cl, Mg, Ca);
- 4) + микроэлементы (Zn, Mn, Co, Mo, Cu, Ni, W, Se, V, B).

Питательные среды для культивирования микроорганизмов кроме соединений, необходимых для биосинтеза, должны включать и источники энергии. По этой причине все микроорганизмы делят на хемотрофы, использующие органические (органотрофы) и неорганические (литотрофы) соединения, и фототрофы, использующие энергию электромагнитного излучения (таблица 1).

Однако какой бы полноценной ни была среда, ее компоненты могут быть недоступны для клетки, если активная кислотность среды (рН) не соответствует значениям, при которых возможно развитие изучаемых организмов. Поэтому после приготовления необходимо проверить рН среды и довести его с помощью щелочей или кислот до нужного значения.

По химическому составу питательные среды делятся на естественные или натуральные неопределенного состава и синтетические, имеющие определенный химический состав.

Таблица 1

Способы существования прокариот

Источник углерода	
Автотрофы	CO ₂ , который служит материалом для биосинтеза углеродных клеточных молекул

Окончание таблицы

Гетеротрофы	Используют углеродные клеточные молекулы других организмов
Источник энергии	
Фототрофы	Энергия электромагнитного излучения
Хемотрофы	Окисление органики (хемоорганотрофы)/неорганики (хемолитотрофы)
Источник электронов в электронтранспортных цепях	
Литотрофы	Восстановленные неорганические молекулы
Органотрофы	Восстановленные органические молекулы

Натуральные среды состоят из продуктов животного или растительного происхождения. К ним относятся овощные или фруктовые соки, отвары и экстракты, полученные из природных продуктов таких, как мясо или почва. На натуральных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, поскольку такие среды содержат все компоненты, необходимые для их роста. Однако эти среды имеют сложный состав и мало пригодны для изучения обмена веществ микроорганизмов, так как в них трудно определять потребление составных компонентов и образование продуктов метаболизма. Натуральные среды используются главным образом для получения накопительных культур микроорганизмов. К числу наиболее применяемых сред относятся мясопептонный бульон, пивное сусло, дрожжевые и картофельные среды, почвенный экстракт и др.

Мясопептонный бульон (МПА) готовится следующим образом: 500 г мяса, очищенного от костей и жира, пропущенного через мясорубку, заливают 1 л водопроводной воды и оставляют при комнатной температуре на 12 ч или на 2 ч в термостате при температуре 37°C. За это время из мяса экстрагируются различные вещества, в том числе и растворимые в воде витамины. Затем мясо отжимают через марлю, и полученный настой кипятят 30 мин. Остывший бульон фильтруют через ватный фильтр и добавляют в него 1 % раствор пептона и 0,5 % раствор хлористого

натрия. Данная питательная среда богата разнообразными питательными веществами, но почти не содержит углеводов. Поэтому при необходимости их следует добавлять к МПА. Затем среда разливается в склянки, и стерилизуются автоклавированием при 1 атм 20 мин. Она может быть использована для культивирования гетеротрофных микроорганизмов.

Пивное сусло. 250 г размолотого солода заливают 1 л водопроводной воды, нагревают до 50°C и выдерживают при данной температуре 30 мин, непрерывно перемешивая. В дальнейшем температуру поднимают до 58°C и выдерживают еще 30 мин до полного осахаривания крахмала, т.е. до тех пор, пока реакция остывшей смеси с йодом не станет отрицательной.

Экстракт фильтруют через ватный фильтр и стерилизуют при 0,5 атм 20 мин в автоклаве. Среда используется для культивирования бактерий, дрожжей, плесневых грибов, использующих сахара.

Дрожжевая среда готовится из 100 г свежих дрожжей, растворенных в 1 л водопроводной воды, которые кипятят 30 мин. После осаждения клеток дрожжей жидкость отфильтровывают через ватный фильтр. К полученному фильтрату добавляют еще 1 л воды, вновь кипятят 30 мин и опять фильтруют. Затем к среде добавляют 2 % раствор углеводов, 0,1 % раствор K_2HPO_4 и 0,5 ный раствор хлористого натрия, рН доводят до 7,0 и стерилизуют 30 мин при 1,5 атм. Среда используется для культивирования гетеротрофных микроорганизмов.

Картофельная среда готовится из 200 г очищенного, вымытого и нарезанного мелкими ломтиками картофеля и 1 л воды. После 30 мин кипячения отвар фильтруют и стерилизуют 30 мин при 1,5 атм. Среда используется для культивирования амилотических бактерий.

Почвенная вытяжка. Для ее приготовления 1 кг почвы заливают 1 л водопроводной воды и кипятят 30 мин. Затем остывшую вытяжку центрифугируют и полученный экстракт стерилизуют при 1,5 атм 30 мин. Среда используется для выделения почвенных микроорганизмов.

Синтетические среды – это среды, в которые входят лишь соединения определенного химического состава, взятые в точно указанных количествах. Однако некоторые микроорганизмы для

своего развития требуют витаминов, что обеспечивается в результате добавления небольшого количества веществ неопределенного состава (дрожжевой экстракт). Такие среды принято называть полусинтетическими. Синтетические и полусинтетические среды широко используются при исследовании обмена веществ, физиологии и биохимии микроорганизмов.

По физическому составу различают жидкие, плотные и сыпучие среды. Жидкие среды широко применяются для накопления биомассы или продуктов обмена, для исследования физиологии и биохимии микроорганизмов, а также для поддержания и сохранения культур, плохо развивающихся на плотных средах. Сыпучие среды применяют главным образом в промышленной микробиологии. К ним относятся разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, пропитанный питательным раствором. Плотные среды используются для выделения чистых культур, в диагностических целях для описания колоний, для определения количества микроорганизмов и их антибиотической активности, для хранения культур.

Агар представляет собой сложный полисахарид, наиболее широко применяемый для уплотнения сред. В его состав входят агароза и агаропектин. Агар получают из морских водорослей. Он удобен тем, что большинство микроорганизмов не используют его в качестве субстрата для роста. В водной среде он образует гель, который плавится при температуре 100°C и затвердевает при 40°C. Поэтому на агаризованных средах можно культивировать большинство микроорганизмов.

Для уплотнения в среду добавляют 1,5 % агара и нагревают до полного его растворения, фильтруют, разливают в склянки и стерилизуют. Для выращивания микроорганизмов в чашках Петри расплавленная среда с агаром разливается в стерильные чашки по 20 мл, после затвердевания среды делается посев микроорганизмов. Следует учитывать, что при остывании агаризованных сред образуется конденсационная вода. Поэтому для получения изолированных колоний микроорганизмов чашки со средой помещают в термостат крышками вниз. В противном случае на внутренней стороне крышки скапливается конденсат, который, стекая на поверхность среды, мешает получению изолированных колоний.

Агар включает небольшое количество легко ассимилируемых органических и минеральных веществ, которые иногда нежелательны для проведения опытов. Поэтому для удаления этих веществ агар перед добавлением к питательной среде заливают дистиллированной водой и выдерживают при 37°C в термостате. Примеси вымываются водой и разлагаются под действием развивающихся в ней микроорганизмов. Когда вода помутнеет, ее заменяют новой и так повторяют до тех пор, пока не исчезнет запах, и вода не перестанет мутнеть. Обычно через 2 – 3 недели получают агар, лишенный растворимых органических и минеральных веществ. Такой агар принято называть выщелоченным агаром.

Желатин – это белок, полученный путем вываривания костей и хрящей животных. Образующий желатином гель плавится при 23 – 26°C, что ниже обычной температуры инкубации многих микроорганизмов. Кроме того, желатин разлагается многими протеолитическими ферментами, выделяющимися в среду некоторыми микроорганизмами. Эти свойства желатина сильно ограничивают его применение в качестве уплотнителя сред. Поэтому его используют, главным образом, для определения протеолитической активности микроорганизмов. Желатин добавляют к жидким средам в количестве 15 %. Повторная стерилизация желатиновых сред, особенно при рН ниже 6,0 или выше 7,3, не рекомендуется, так как желатин при этом теряет способность образовывать гель.

Элективные среды предназначены для выделения определенных экологических групп микроорганизмов, для которых характерна общность физиологических свойств. Например, микроорганизмы, способные фиксировать молекулярный азот, могут расти в среде, из состава которой исключены связанные формы азота. Элективные среды для автотрофных микроорганизмов содержат в качестве единственного источника углерода только CO₂, что исключает массовое развитие гетеротрофов. Разработанные С.Н. Виноградским и М. Бейенриком, в зарубежной литературе такие среды называются чаще «накопительные» или «селективные».

В настоящее время большое количество питательных сред изготавливается в промышленных условиях и поставляется либо

в готовом виде, либо в виде основы для приготовления, согласно указаниям производителя.

Требования, предъявляемые к питательным средам:

1) в среде должны быть все необходимые для роста и развития химические элементы;

2) среда должна быть сбалансирована по химическому составу. Это значит, что соотношение химических элементов питательной среды и главным образом соотношение органических элементов – C:N должно примерно соответствовать этому соотношению в клетке;

3) среды должны иметь достаточную влажность, обеспечивающую возможность диффузии питательных веществ в клетку. Для грибов эта влажность обеспечивается содержанием влаги в субстрате не менее 12 %, для бактерий – не менее 20 %;

4) среда должна иметь определенное значение pH среды. Среди микроорганизмов различают ацидофилы (кислотолюбивые микроорганизмы), алкалофилы (щелочелюбивые микроорганизмы) и нейтрофилы (лучше всего растут в нейтральной среде с pH около 7,0). К ацидофилам относятся грибы и дрожжи. Большинство бактерий – нейтрофилы, для которых активная кислотность среды около 4 ед. pH является губительной. Следует помнить, что при стерилизации среды и в процессе культивирования микроорганизмов, кислотность среды может сильно изменяться. Во избежание изменения pH в среду добавляют буферные системы (например, фосфатный буфер), CaCO_3 (для нейтрализации образующихся в результате культивирования органических кислот), вещества органической природы, обладающие буферными свойствами (например, аминокислоты, полипептиды, белки) и др;

5) среды должны быть изотоничными для микробной клетки, т.е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки;

6) среды должны обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом (rH_2), определяющим насыщение ее кислородом. По шкале от 0 до 41 этим индексом можно обозначить любую степень аэробности: насыщенный кислородом раствор обозначают $\text{rH}_2=41$, насыщенный водородом $\text{rH}_2=0$. Обли-

гатные анаэробы размножаются при pH_2 не выше 5, аэробы – не ниже 10;

7) среды должны быть стерильными, что обеспечивает рост чистых культур микроорганизмов.

1.2. Стерилизация питательных сред и оборудования

Микробиолог имеет дело преимущественно с чистыми культурами микроорганизмов (моноклональными), которые представляют собой потомство одной клетки. Поскольку в воздухе и на поверхности предметов всегда присутствует большое количество разнообразных микроорганизмов, следует постоянно заботиться о сохранении чистоты изучаемых культур. Поэтому при работе в микробиологической лаборатории необходимо строго соблюдать определенные правила, обеспечивающие стерильность сред и чистоту изучаемых объектов.

Стерилизация в переводе с латинского означает «обеспложивание». В микробиологии под стерилизацией понимают гибель всех вегетативных и покоящихся форм микроорганизмов. Для этой цели стерилизуют среды, посуду и инструменты, чтобы не допустить развития посторонней микрофлоры в исследуемых культурах.

Питательные среды стерилизуют главным образом автоклавированием. Этот способ основан на прогревании субстрата насыщенным паром при давлении выше атмосферного. При совместном действии высокой температуры и давления, возникающего при автоклавировании, погибают вегетативные формы и споры микроорганизмов. Автоклавирование проводят в различных режимах. Когда указывается режим стерилизации в единицах давления: 0,5; 1,0; 1,5 атм, имеют в виду дополнительное давление. Условия повышенного давления пара создают в специальных герметически закрывающихся толстостенных аппаратах – автоклавах, с устройством и работой которых студенты знакомятся на практических занятиях.

Среды, предназначенные для стерилизации в автоклаве, наливают не выше половины высоты сосуда, который закрывают

ватной пробкой. Пробки должны быть достаточно плотными и в то же время хорошо пропускать воздух. Нельзя обертывать пробки целлофаном или другими материалами, не пропускающими пар, который должен обязательно проникать через пробку в сосуд, иначе среда не прогреется до нужной температуры и не простерилизуется. Режим автоклавирования определяется прежде всего составом питательной среды. Среда, содержащие вещества, не выдерживающие нагревания до 120°C, стерилизуют при 0,5 атм. К таким средам относится молоко, дрожжевой автолизат и среды с желатином, стерилизация которых не должна превышать 15 мин. Среда, содержащие сахара и витамины, например, сусло и соки, стерилизуют 20 – 30 мин. Мясопептонный бульон и мясопептонный агар автоклавируют при 1 атм. 20 – 30 мин, картофельную среду и почвенную вытяжку при 1,5 атм. 30 мин.

Выбирая режим стерилизации, необходимо учитывать pH среды. В кислых условиях при стерилизации могут подвергнуться гидролизу полимеры, а в щелочных – выпасть в осадок соли железа. Чтобы этого избежать, среды, предназначенные для культивирования кислотолюбивых или щелочнолюбивых микроорганизмов, стерилизуют при нейтральном значении pH и только после автоклавирования подкисляют или подщелачивают среду до нужного значения.

Стеклянная посуда, используемая в микробиологических исследованиях, стерилизуется горячим воздухом в сушильных шкафах при 160 – 180°C в течение 2 ч. При этом погибают вегетативные клетки и споры микроорганизмов. Посуду перед стерилизацией тщательно моют, сушат и заворачивают в бумагу для сохранения стерильности после прогревания. Чашки Петри закрывают парами, пипетки и шпатели – по отдельности, колбы и пробирки закрывают пробками, на которые надевают бумажные колпачки. Посуду, подготовленную для стерилизации, загружают в сушильный шкаф не слишком плотно, чтобы не затруднять циркуляцию воздуха и обеспечить равномерный прогрев стерилизуемого материала.

Для стерилизации сред, меняющих свою структуру при нагревании до высоких температур, используется метод тиндализации (дробной стерилизации), предложенный английским ученым Тиндалем. Принцип метода заключается в том, что среду

или ее компоненты прогревают без избыточного давления несколько раз, и в период между прогреваниями дают прорасти жизнеспособным спорам. Предполагается, что возникающие из спор клетки погибают при последующем прогревании, не успев образовать новые персистирующие формы. Обычно используют температуру 100°C и 3 – 4 цикла прогревания до появления пара.

На метод дробной стерилизации, предложенный Тиндалем, похож метод пастеризации, разработанный Луи Пастером. Схема метода такова же, но используют более низкие температуры (около 60°). Или однократное прогревание до 95°. Пастеризация широко используется в пищевой промышленности.

Для стерилизации субстратов, не выдерживающих нагревания (термолабильные белки, витамины, некоторые антибиотики, летучие углеводороды и пр.), используют метод фильтрации. Способ заключается в пропускании жидкостей через специальные мелкопористые бактериальные фильтры, диаметр пор которых меньше среднего размера бактерий (~0.75 мкм).

Стерилизация газообразными веществами. Аппаратуру, имеющую зеркальное, оптическое и радиоэлектронное оборудование, а также изделия из термолабильных пластмасс, например, центрифужные пробирки, стерилизуют газовым методом. Для газовой стерилизации применяются только те соединения, которые обладают выраженными бактерицидными свойствами. Это оксид этилена, оксид пропилена, формальдегид, озон и др. Газовую стерилизацию проводят в специальных герметически закрытых аппаратах.

1.3. Подготовка микробиологической лаборатории к работе

Для поддержания чистоты моноклональных культур бактерий, учебную микробиологическую лабораторию необходимо держать в чистоте. Для предотвращения микробной контаминации (попадание чужеродных микроорганизмов) исследуемых бактерий применяют различные способы дезинфекции. «Дезинфекция», часто используемый в медицине термин, обозначает уничтожение возбудителей инфекционных болезней на объектах

внешней среды. В биологических учебных лабораториях под термином «дезинфекция» следует понимать микробную деконтаминацию как частичное удаление микроорганизмов с объектов внешней среды или из организма человека с помощью стерилизационных факторов.

Воздух в помещении дезинфицируют самым простым способом – проветриванием. Продолжительная вентиляция в течение часа приводит к резкому снижению количества микроорганизмов в воздухе. Для более эффективной деконтаминации воздуха используют облучение ультрафиолетовыми лучами. Чаще всего используют средний диапазон УФ-В (320 - 280 нм) и дальний УФ-С (280 – 100 нм). Именно эти спектры обладают максимальной антимикробной активностью, воздействуя напрямую на генетический аппарат клетки и систему синтеза белка. Так УФ-излучение обладает слабой проникающей способностью, обработку воздуха этим методом проводят с периодичностью каждые 3–4 часа в зависимости от потоковой нагрузки на учебную лабораторию.

Пол, оборудование и стены лаборатории протирают растворами дезинфицирующих веществ. Чаще всего используется 3 % раствор хлорамина (или другие хлорсодержащие дезинфектанты).

Рабочее место обрабатывается дезсредствами до начала работы и после ее окончания. В учебных микробиологических лабораториях используются 70 % раствор этилового спирта или 3 % раствор перекиси водорода.

1.4. Правила работы с культурами микроорганизмов

Работа с чистыми культурами микроорганизмов осуществляется в специальном помещении – микробиологическом боксе. Бокс представляет собой изолированную комнату, с минимальным набором предметов. Обычно это стерильный стол, стулья, я или спиртовая горелка и бактерицидная лампа. Вход в бокс разрешен только в чистом халате, шапочке, медицинской маске и бахилах. Перед работой помещение бокса моют и дезинфицируют, а после влажной уборки в течение 30–60 мин проводят стерилизацию воздуха бактерицидными лампами.

В современных лабораториях используются ламинарные боксы. Это шкаф, в котором создаются ламинарные потоки стерильного воздуха, поэтому исследуемые культуры максимально защищены от контаминации.

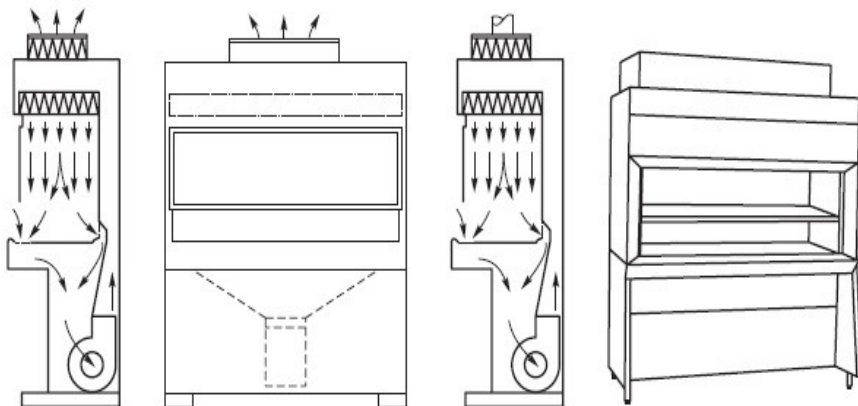


Рисунок 1. Устройство ламинарного бокса

Ламинарные боксы бывают двух степеней защиты: класс I и класс II. В первых воздух помещения, прошедший через бактериальный фильтр, подается в направлении исследователя, то есть в помещение, где проводится работа, поэтому стерильность таких ламинарных боксов низкая. В ламинарах II класса создается замкнутая циркуляция стерильного воздуха (рисунок 1). Конструкция позволяет проводить стерильные посевы микроорганизмов (в том числе и патогенных!) в струе стерильного воздуха, распределяемого внутри ламинара.

Студенты на занятиях получают культуры, выращенные на чашках Петри, в стерильных пробирках или планшетах (рисунок 2).

Так как культуры используются однократно, студенты работают с ними на заранее подготовленных рабочих столах. Лабораторный стол должен быть хорошо освещен солнечным или искусственным светом. За каждой группой студентов закрепляется постоянное рабочее место. В зависимости от темы занятия рабочее место оснащается необходимыми материалами и оборудованием: спиртовкой; штативом под пробирки; бактериологической

петлей или иглой, набором красителей и реактивов для окраски препаратов; микроскопом; лотком с рельсами для размещения предметных стекол при окраске препаратов; промывалкой или колбой с водой и трубкой (для промывки окрашенных препаратов); предметными и покровными стеклами; флаконом с иммерсионным маслом; фильтровальной бумагой; марлей, карандашом или маркером по стеклу и т.д.

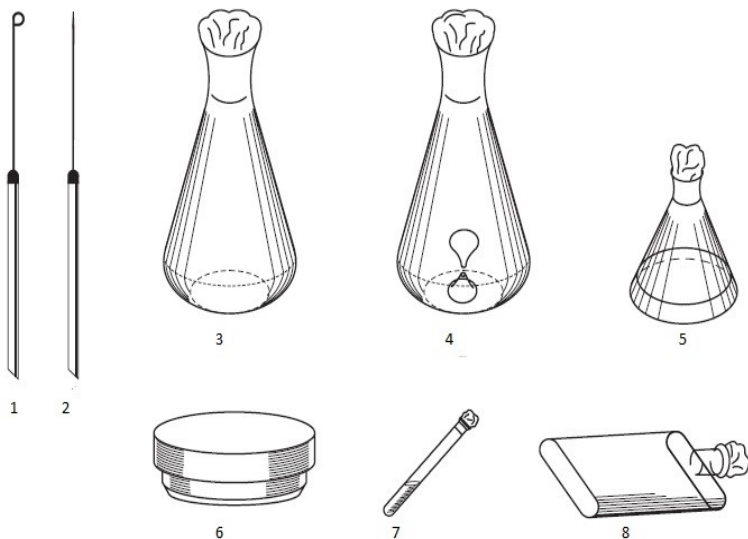


Рисунок 2. Посуда, используемая в микробиологической лаборатории: 1 – микробиологическая петля; 2 – бактериологическая игла; 3 – колба Эрленмейера; 4 – колба Эрленмейера с отбойниками; 5 – коническая колба; 6 – чашка Петри; 7 – пробирка со скошенным агаром; 8 – матрაც

Все манипуляции с бактериями проводятся около пламени горелки таким образом, чтобы пламя находилось между исследователем и чашкой Петри (или пробиркой со скошенным агаром). Клетки микроорганизмов для приготовления препаратов с твердой питательной среды берут микробиологической петлей. Петлю перед взятием образца стерилизуют в пламени горелки. Для этого металлическую проволоку прокаливают докрасна и одно-

временно прожигают ближайшую к петле часть держателя, которая будет вводиться внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы. Нагретую петлю охлаждают о незасеянный слой агара или о стерильную внутреннюю поверхность лабораторной посуды. Затем мягким плавным касанием берут часть бактериальной культуры с микробной колонии, которую хорошо видно на твердом агаре. При избыточно сильном нажатии петлей возможно вместе с исследуемыми клетками взять часть агаризованной питательной среды, что затруднит дальнейшую работу с препаратами. После приготовления необходимого препарата с изъятым образцом бактерий, петлю снова стерилизуют прокаливанием.

1.5. Приготовление реактивов

Прежде чем готовить рабочие растворы красок, заблаговременно готовят их насыщенные спиртовые растворы. Для этого краски заливают этиловым спиртом в соотношении 1:10 и выдерживают в термостате до полного растворения красок. При этом нерастворимая часть красок выпадает в осадок и её отфильтровывают. Из насыщенных растворов в дальнейшем готовят рабочие растворы.

Фуксин основной – солянокислая соль розанилина, блестящие зеленые кристаллы, хорошо растворимые в этиловом спирте и плохо в воде; цвет спиртового раствора ярко-красный. Насыщенный раствор готовят растворением 10 г сухого основного фуксина в 100 мл этилового спирта. Из него готовят рабочий раствор в результате смешивания 10 мл со 100 мл воды.

Фуксин карболовый (Циля). Для приготовления берут 10 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина и 100 мл 5 % водного раствора фенола.

Водный раствор при постоянном взбалтывании постепенно приливают к первому, а не наоборот. После смешивания готовый раствор фильтруют через бумажный фильтр и хранят в тщательно упакованной бутылки из темного стекла.

Карболовый фуксин Циля можно приготовить и по следующему рецепту: 1г основного кристаллического фуксина, 5г кристаллического фенола, несколько капель глицерина, 10 мл

этилового спирта, 100 мл воды. Сначала краски смешивают и растирают в ступке, добавляя по каплям глицерин. Затем, при постоянном перемешивании, по каплям добавляют спирт, постепенно увеличивая порции, а после этого, начиная с малых порций, добавляют воду. Приготовленный в ступке раствор выдерживают 46 ч в термостате при 37°C для полного растворения фуксина, после чего фильтруют через бумажный фильтр. Краска довольно стойкая и может храниться длительное время. Она употребляется при работе с трудноокрашиваемыми объектами – кислотоустойчивые и спорообразующие бактерии.

Раствор Люголя. Основная составная часть данного раствора – кристаллический йод. Для его приготовления берут 1 г кристаллического йода и 2 г йодистого калия, растворяют в 300 мл дистиллированной воды. Йод плохо растворяется в воде, поэтому необходимо сначала в 5–10 мл воды растворить йодистый калий, затем прибавить кристаллический йод и только после полного растворения йода добавить дистиллированную воду, доводя объем до 300 мл. Раствор фильтруют и хранят в темной склянке в прохладном месте. Применяется для окраски бактерий по Граму.

Метиленовый синий (раствор Леффлера)- мелкие зеленые кристаллы с металлическим блеском, хорошо растворимые в спирте и воде; цвет раствора синий. К 30 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего (7 г на 100 мл спирта) добавляют 100 мл дистиллированной воды и 1 мл 1 % водного раствора едкого кали (или едкого натра). Раствор краски может долго храниться; по истечении некоторого времени красит лучше, чем свежеприготовленный. Используется в методике окраски спор.

Генциановый фиолетовый карболовый. 1г генцианового фиолетового растворяют в 10 мл спирта, полученный раствор смешивают со 100 мл 5 % водного свежеприготовленного раствора фенола. Для устранения образования осадка на препарате к раствору приливают еще несколько капель спирта до исчезновения с поверхности металлически блестящей зеленоватой пленки. Применяется в методике окраски по Граму.

Кристаллический фиолетовый. 20 мг кристаллического фиолетового растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Применяют при окраске бактерий по Граму.

Судан. 0,5 г судана растворяют в 100 мл концентрированной молочной кислоты. Используют для выявления липидов.

Тушь для негативной окраски капсул. Обычную тушь разводят в 10 раз дистиллированной водой и центрифугируют. Надосадочный слой сливают, разливают в пробирки и стерилизуют. Сохранность туши может быть обеспечена в результате добавления детергента (1:100) тритона-100.

Хромовая смесь применяется для мытья посуды. В концентрированную серную кислоту добавляют 5 % (от объема серной кислоты) размельченного в порошок кристаллического двуххромовокислого калия и осторожно нагревают в фарфоровой чашке на водяной бане до его растворения. После многократного употребления темно-оранжевый цвет хромовой смеси меняется на темно-зеленый. Такая хромовая смесь не обладает моющими свойствами. Хромовой смесью не следует мыть посуду, загрязненную парафином, керосином, минеральными маслами и другими продуктами перегонки нефти. Хромовая смесь сильно разрушает ткани животного и растительного происхождения, поэтому работать с ней следует осторожно. Если хромовая смесь попала на руки или одежду, то пораженное место немедленно обмывают большим количеством воды, а затем разбавленным раствором аммиака или соды, а затем снова водой.

Спиртовый раствор КОН – также хорошее моющее средство. Его готовят растворением 50 г КОН в 500 мл воды. После остывания раствора к нему добавляют этиловый спирт, чтобы общий объем составил 1 л.

Промывка стекол. Предметные и покровные стекла считаются чистыми, когда капля воды растекается по их поверхности.

Новые стекла обычно кипятят в 1 %-ном растворе соды, затем промывают дистиллированной водой.

Стекла, бывшие в употреблении, кипятят в мыльной воде и затем не менее суток выдерживают в растворе хромовой смеси. От бихромата стекла отмывают дистиллированной водой. Чистые стекла хранят в этиловом спирте.

Если оборот стекол при работе в лаборатории интенсивен, указанных выше методов обработки недостаточно. Для обезжиривания в таком случае стекла кипятят в течение 10 минут в растворе следующего состава: бихромат калия – 20 г, дистиллиро-

ванная вода – 200 мл, концентрированная серная кислота – 20 мл. Затем промывают в течение 5 минут слабым раствором NaOH с последующей промывкой в проточной водопроводной воде.

Стекла, высушенные в вертикальном положении в сухожаровом шкафу, хранят в банках с притертой пробкой, наполненных смесью Никифорова (смесь этилового спирта и этилового эфира соотношением 1:1)

При отсутствии заранее приготовленных обезжиренных стекол можно быстро приготовить стекла, натирая их в сухом виде хозяйственным мылом и очищая затем чистой хлопчатобумажной тканью.

Средства для обработки рабочего стола. Готовят 3 % раствор хлорамина. Для этого в литр водопроводной очищенной воды вносят 30 г хлорамина и перемешивают жидкость для полного растворения препарата.

При работе с анаэробными микроорганизмами для обработки рабочих поверхностей используют стандартный 3 % раствор перекиси водорода.

1.6. Методические инструкции к ведению лабораторных записей

Отчет по лабораторной работе является документом, позволяющим контролировать правильность полученных данных, а также является одним из инструментов оценивания работы студента. В нем должны быть отображены сведения, имеющие отношения к выполнению данной работы.

Отчет должен содержать нижеуказанные разделы:

- 1) титульный лист, оформленный согласно текущим образовательным стандартам (название учреждения, тема работы, фамилия исполнителя, фамилия руководителя, место и год проведения);
- 2) введение, которое раскрывает содержание работы, актуальность, цель, задачи;
- 3) теоретическая часть, описывающая главные понятия исследуемой в лабораторной работе темы;

- 4) объекты исследования: систематическая принадлежность используемых в работе бактерий;
- 5) ход работы: основной принцип используемого метода анализа;
- 6) полученные результаты;
- 7) обсуждение: интерпретация экспериментальных данных и сведений из научной литературы;
- 8) список используемой литературы.

Цифровой материал приводят в таблицах. При необходимости делают графики, гистограммы и рисунки.

1.7. Устройство микроскопа и правила работы с ним

Микроскоп (от греч. *micros* – малый и *scopio* – смотрю) – это оптический прибор, состоящий из трех основных частей: механической, оптической и осветительной.

Схема светового биологического микроскопа представлена на рисунке 3.

Механическая часть или штатив состоит из ножки, основания, тубусодержателя, предметного столика, монокулярной насадки (тубуса), револьверного устройства, рукоятки грубой фокусировки (макрометрического винта), рукоятки тонкой фокусировки (микрометрического винта).

Тубус – зрительная труба микроскопа. В верхнее отверстие тубуса свободно вставляется окуляр, на нижнем конце тубуса находится вращающееся вокруг своей оси револьверное устройство (револьвер), в которое ввинчиваются объективы. Вращая револьвер, можно быстро сменить объективы во время работы с микроскопом, подводя любой объектив под тубус. Объектив должен быть центрирован, т.е. установлен на оптическую ось микроскопа. Для этого револьвер поворачивают вокруг своей оси до появления щелчка.

Предметный столик служит для размещения на нем изучаемого препарата. Препарат закрепляют на столике зажимами (клеммами). В центре предметного столика находится отверстие для прохождения лучей света и освещения препарата. В некото-

рых конструкциях микроскопа предметный столик может передвигаться с помощью винтов, расположенных по периферии предметного столика. Это дает возможность рассмотреть препарат в различных полях зрения.

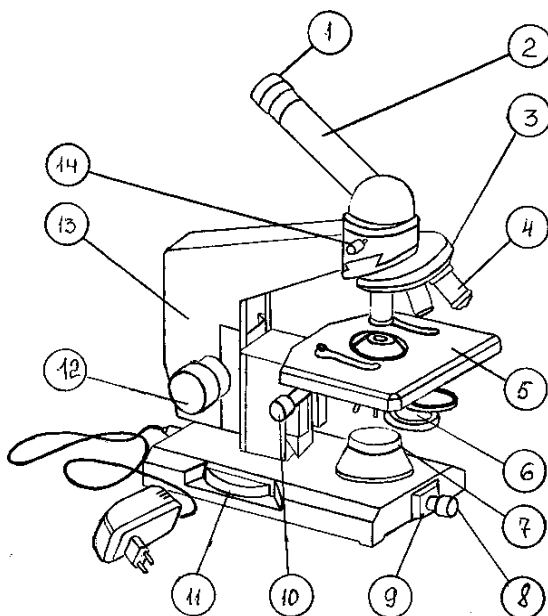


Рисунок 3. Схема устройства светового биологического микроскопа. 1 – окуляр; 2 – монокулярная насадка (тубус); 3 – револьверное устройство; 4 – объектив; 5 – предметный столик; 6 – конденсор; 7 – корпус коллекторной линзы; 8 – патрон с лампой; 9 – шарнир; 10 – рукоятка перемещения кронштейна конденсора; 11 – рукоятка тонкой фокусировки (микрометрический винт); 12 – рукоятка грубой фокусировки (макрометрический винт); 13 – тубусодержатель; 14 – винт для крепления насадки

Рукоятки грубой и тонкой фокусировки (макро- и микро- винты) служат для перемещения тубуса вверх и вниз, что позволяет установить его на необходимом расстоянии от препарата. При вращении винтов по часовой стрелке тубус опускается, а при вращении против часовой стрелки – поднимается. При вращении макрометрического винта объектив ориентировочно

устанавливается на фокус, т.е. на то расстояние от препарата, при котором он делается видимым. Оборот макровинта позволяет переместить тубус на 20 мм. Микрометрический винт служит для точной установки на фокус. Полный оборот его перемещает тубус на 0,1 мм. С микровинтом следует обращаться очень осторожно: допустимо вращение микровинта не более чем на 180° в ту или иную сторону.

Оптическая часть является наиболее ценной частью микроскопа. Она состоит из объективов и окуляра.

Окуляр (от лат. *oculus* – глаз) состоит из двух плосковыпуклых линз, заключенных в общую металлическую оправу. Верхняя линза – глазная (увеличивающая), нижняя – собирающая. Расстояние между линзами равно полусумме их фокусного расстояния.

У окуляров с большим увеличением фокус короче, поэтому меньше и длина окуляра. Между линзами *имеется диафрагма, ограничивающая поле зрения и задерживающая краевые лучи света*. Отечественные микроскопы снабжены тремя сменными окулярами, увеличение которых указано на корпусе окуляра (x7; x10; x15).

Объективы ввинчиваются в гнезда револьверного устройства и состоят из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Передняя (фронтальная) линза объектива является самой маленькой и единственной, дающей увеличение. Остальные линзы в объективе только исправляют недостатки полученного изображения (явления сферической и хроматической аберрации) и называются коррекционными.

В гнезда револьверного устройства ввинчиваются четыре объектива, увеличение которых указано на корпусе объектива (x8; x20; x40; x90 или 100). Каждый объектив характеризуется своим фокусным расстоянием (расстоянием между предметным стеклом и фронтальной линзой): объектив x8 имеет фокусное расстояние около 9 мм, объектив x40 – 0,65 мм, объектив x90 – 0,15 мм.

Объективы подразделяются на *сухие* и *иммерсионные*.

При работе с *сухими объективами* (x8, x20, x40) между фронтальной линзой и препаратом находится воздух. В этом случае лучи света проходят среды с различными показателями

преломления (покровное стекло, воздух), часть их отклоняется и не попадает в объектив.

При работе с *иммерсионными объективами* (x90 или x100) для устранения светорассеяния расстояние между фронтальной линзой объектива и препаратом заполняют иммерсионным (кедровым) маслом, показатель преломления лучей света которого близок к показателю преломления лучей света, проходящего через стекло.

Общее увеличение микроскопа определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, если в работе используют окуляр x15, а под тубусом находится объектив x90, то увеличение рассматриваемого с помощью микроскопа объекта составит x1350.

Осветительная часть микроскопа состоит из двухлинзового конденсора, ирис-диафрагмы и патрона с низковольтной лампочкой накаливания, питающейся через понижающий трансформатор от сети напряжения 120...220 В.

Конденсор служит для лучшего освещения препарата. Он собирает световые лучи в пучок и направляет их через отверстие предметного столика на препарат. С помощью рукоятки для перемещения кронштейна конденсора его можно перемещать вверх и вниз, благодаря чему меняется угол сходимости лучей и, следовательно, степень освещения объекта. Чем выше положение конденсора, тем лучше освещен препарат.

Ирис-диафрагма располагается под конденсором и служит для регулировки потока света, поступающего в конденсор. Она состоит из металлических серповидных пластинок. Расширить или сузить отверстие диафрагмы можно с помощью специального рычажка. При вращении его по часовой стрелке отверстие ирис-диафрагмы увеличивается и, следовательно, увеличивается степень освещения объекта.

При работе с иммерсионными объективами степень освещения препарата должна быть максимальной, поэтому шторку ирис-диафрагмы открывают, а конденсор поднимают в крайнее верхнее положение.

При работе с сухими объективами, как правило, рассматривают неокрашенные объекты. Для достижения контрастности конденсор опускают вниз, а отверстие ирис-диафрагмы уменьшают.

Правила работы с микроскопом

1. На рабочем столе микроскоп ставят тубусодержателем к себе на расстоянии 3–5 см от края стола.

2. Включают микроскоп в сеть и устанавливают правильное освещение.

3. На предметный столик помещают исследуемый препарат и закрепляют его клеммами.

4. Под тубус помещают нужный объектив и с помощью макро и микровинтов устанавливают фокусное расстояние. Так, при работе с иммерсионными объективами на препарат предварительно наносят каплю иммерсионного масла и осторожно опускают тубусодержатель макровинтом до соприкосновения со стеклом. Затем, внимательно смотря в окуляр, очень медленно поднимают тубусодержатель, вращая его против часовой стрелки, до тех пор, пока не увидят изображение. Точную наводку объектива на фокус производят микрометрическим винтом. При работе с сухими объективами препарат вначале рассматривают с объективом х8. Поднимая с помощью макровинта тубусодержатель и внимательно смотря в окуляр, устанавливают фокусное расстояние (около 9 мм) и добиваются четкости изображения, используя микрометрический винт. Далее, двигая предметный столик или предметное стекло, устанавливают в центр поля тот участок препарата, в котором лучше всего виден изучаемый объект. Затем, вращая револьверное устройство вокруг своей оси, под тубус помещают объектив на х20 или х40. При этом под тубус не должен попасть объектив х90. В револьверном устройстве объективы располагаются таким образом, что если найдено изображение с объективом х8, то при рассмотрении препарата с объективами большего увеличения нужно слегка подрегулировать четкость изображения с помощью макро- и микрометрических винтов.

5. Во время микроскопирования необходимо держать оба глаза открытыми и пользоваться ими попеременно.

6. После окончания работы следует убрать препарат с предметного столика, опустить вниз конденсор, поставить под тубус объектив х8, удалить мягкой тканью или марлей, смоченной в спирте, иммерсионное масло с фронтальной линзы объектива х90, под объектив положить марлевую салфетку, опустить тубусодержатель.

Глава 2. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Занятие 1. Морфологическое разнообразие бактерий

Изучение морфологии и строения клеток микроорганизмов целесообразно начать со знакомства с размерами, формой и возможными сочетаниями клеток у различных представителей мира прокариот, а затем уже перейти к детальному рассмотрению клеточных структур.

Размеры бактерий выражают в микрометрах (мкм). Один микрометр равен 1000 нм (нанометров). Для сравнения: 1 мм = 10^3 мкм = 10^6 нм = 10^9 пм (пикометров).

Типичная бактериальная клетка – приблизительно 1 мкм в диаметре, в то время как большинство эукариотических клеток – от 10 до 100 мкм. В среднем линейные размеры бактерий лежат в пределах 0,5 – 3,0 мкм. Но некоторые бактерии могут иметь гигантские размеры, например: клетки нитчатой серобактерии *Beggiatoa alba* имеют диаметр до 50 мкм; *Achromatium oxaliferum* имеет в длину 15 – 100 мкм при поперечнике примерно 5 – 33 мкм, а длина клетки спирохеты может быть до 250 мкм. Самые мелкие из известных прокариотных клеток – микоплазмы диаметром клеток 0,1 – 0,15 мкм.

Морфологические типы бактерий по сравнению с высшими организмами немногочисленны. Клетки значительной части бактерий имеют сферическую, цилиндрическую или извитую формы (рисунок 4).



Рисунок 4. Морфология бактерий.

Кокковые формы: 1 – диплококки, 2 – стрептококки, 3 – тетракокки, 4 – сарцины, 5 – стафилококки; цилиндрические формы: 6 – одиночные палочки и цепочки клеток; извитые формы: 7 – вибрионы, 8 – спирали, 9 – спирохеты

Сферические формы бактерий – кокки после деления могут существовать в виде отдельных клеток, называемых микрококки (*micro* – малый) или образовывать сочетания клеток различной формы. Кокки, делящиеся в одной плоскости и в одном направлении, могут образовывать пары, связанные клеточным чехлом – диплококки (*diplos* – двойной) или цепочки клеток – стрептококки (*streptos* – цепь).

Когда деление происходит равномерно в двух перпендикулярных плоскостях, возникают группы из четырех клеток – тетракокки, а если в трех, то образуются пакеты правильной формы – сарцины (*sarceo* – соединяю). При неравномерном делении в нескольких плоскостях наблюдаются скопления неправильной формы, напоминающие гроздь винограда, – стафилококки (*staphyle* – виноградная гроздь) (рисунок 5).

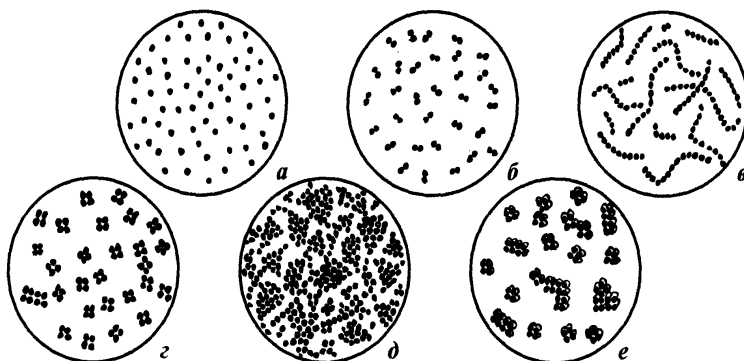


Рисунок 5. Взаимные расположения кокков:

а – микрококки; б – диплококки; в – стрептококки; г – тетракокки;
д – стафилококки; е – сарцины

Цилиндрические формы бактерий имеют вид палочек с прямыми, округлыми или заостренными концами. Они нередко образуют пары или цепочки клеток. Для ряда палочек, относящихся к разным видам, характерен выраженный полиморфизм. Изменение формы, связанной с развитием бактерий, наблюдается у азотобактера и клубеньковых

бактерий. В молодой культуре азотобактера можно обнаружить клетки не только палочковидной, но и овальной форм.

Палочковидные бактерии делят на неспорообразующие (бактерии (греч. *bacteria* – палочка)) и спорообразующие (бациллы (лат. *bacillus* – палочка)).

Палочковидные бактерии могут располагаться поодиночке, попарно (диплобактерии) и цепочками (стрептобактерии).

При микроскопии легко можно определить спорообразующие и не спорообразующие формы палочковидных бактерий. Вегетативные клетки хорошо адсорбируют красители на своей поверхности и полностью окрашиваются. Оболочка споры малопроницаема, краски в них почти не проникают и под микроскопом споры имеют вид округлых или овальных блестящих зерен. Палочки, образующие споры называются бациллами и клостридиями. У бацилл размер споры не превышает ширину клетки и поэтому при образовании споры форма клетки не меняется. У клостридий диаметр споры больше толщины клетки и поэтому при созревании споры клетка приобретает форму веретена (если спора располагается в центре клетки) или барабанной палочки (если спора располагается на одном из полюсов клетки). На рисунке 6 представлены морфологические разновидности палочковидных бактерий.

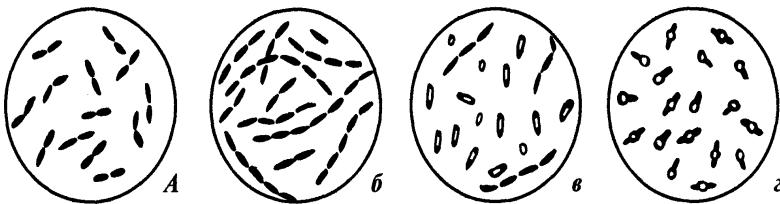


Рисунок 6. Морфология палочковидных бактерий: а – диплобактерии; б – стрептобактерии; в – бациллы; г – клостридии

Извитые формы бактерий бывают трех типов: вибрионы, спираиллы и спирохеты. Вибрионы выглядят как слегка изогнутые палочки. Спираиллы имеют два или более крупных

завитков, а спирохеты – клетки, с многочисленными мелкими завитками, длина которых во много раз превышает их диаметр.

За последнее время среди прокариот обнаружены организмы, отличающиеся от описанных выше основных форм. Некоторые бактерии имеют вид кольца, замкнутого или разомкнутого, в зависимости от стадии роста. У прокариот, размножающихся в основном почкованием, описано образование клеточных выростов (простек), число которых может колебаться от 1 до 8 и более. Для некоторых видов характерно слабое или довольно хорошо выраженное ветвление.

Так же к извитым формам относят:

Риккетсии – мелкие грамотрицательные палочковидные бактерии размером 0,35 – 1 мкм; облигатные внутриклеточные паразиты. Форма и размер риккетсий могут меняться (клетки неправильной формы, нитевидные) в зависимости от условий роста. В мазках и тканях их окрашивают по методу Романовского-Гимзы или по П.Ф. Здродовскому.

Актиномицеты – ветвящиеся грамположительные бактерии. Свое название (от греч. *actis* – луч, *mykes* – гриб) они получили в связи с возникновением в пораженных тканях друз-гранул из плотно переплетенных нитей в виде лучей, отходящих от центра и заканчивающихся колбовидными утолщениями. Актиномицеты, как и грибы, образуют мицелий – нитевидные переплетающиеся клетки (гифы). Они формируют субстратный мицелий, появляющийся в результате врастания мицелия в питательную среду, и воздушный, растущий на поверхности среды.

Приготовление препаратов

Морфологическое разнообразие клеток микроорганизмов можно изучать с помощью различных методов микроскопии, а также применяя некоторые способы дифференциальной окраски. Выбор метода окраски и микроскопии диктуется конкретными целями исследования.

Микроскопические исследования бактерий можно осуществлять, рассматривая их как в живом состоянии без окрашивания или в прижизненно окрашенных временных

препаратах, так и в специально приготовленных постоянных препаратах, в которых клетки бактерий убиты. Постоянными, или фиксированными, называются такие препараты, в которых микроорганизмы зафиксированы, т.е. прикреплены к предметному стеклу, а после окрашены. Фиксация имеет целью убить бактериальные клетки, возможно полностью сохранив при этом их прижизненную структуру. Известно много способов фиксации препаратов. Наиболее распространена фиксация жаром (флабирование). Этим способом хорошо фиксируется форма бактериальной клетки и хуже ее размеры, так как происходит частичное сморщивание клеток, нарушается также структура внутриклеточных органелл. Поэтому для изучения внутреннего строения клеток бактериальные препараты фиксируют химическими веществами: 95 %-ным этиловым спиртом или смесью равных объемов этилового спирта и эфира.

Препараты готовятся на предметных стеклах, толщина которых 1,2 – 1,4 мм. В ином случае изображение получается размытым, так как не соблюдается условия, необходимые для создания иммерсионной системы (описано в соответствующем разделе пособия).

Для окрашивания используют спиртовые или водные растворы анилиновых красителей. Наиболее удобными из них являются красные краски – фуксин основной, сафранин (2 мин) и синие краски – метиленовый синий (5 мин), генцианвиолет (2 мин).

Методы окраски могут быть простыми, когда препарат обрабатывается одним красителем, и сложными, если для окраски используются два и более красителей.

Методика.

1) Приготовление мазка. Чистое обезжиренное предметное стекло пинцетом достают из банки с окрашенным спиртом и проносят через пламя горелки. После сгорания спирта подсушенное стекло кладут на подставку и пипеткой в центр его наносят небольшую каплю воды. *Важно:* при необходимости извлечь несколько стекол из банки, следует следить за тем, чтобы горящий спирт не остался на пинцете при заборе следующих стекол!

В правую руку берут металлическую петлю и прокаливают её в пламени горелки. Затем охлажденной петлей отбирают небольшое количество бактериальной культуры и вносят её в каплю воды, которая в дальнейшем распределяется по поверхности стекла тонким слоем. Суспензию клеток необходимо равномерно распределить с краю предметного стекла, чтобы будущий окрашенный препарат занимал $\frac{2}{3}$ от всей поверхности. $\frac{1}{3}$ необходима для манипуляции препаратом при дальнейшей окраске.

Петля затем прокаливается в пламени горелки, а предметное стекло с нанесённым мазком выдерживается при комнатной температуре до полного высыхания препарата.

2) Высушивание мазка лучше всего проводить при комнатной температуре. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает достаточно быстро. Если высыхание происходит медленно, то препарат сушат в струе теплого воздуха на расстоянии 20 см от пламени горелки. *Важно:* нельзя перегревать мазок в процессе высушивания, это может привести к деформации клеток микроорганизмов!

3) Фиксация. Высушенный препарат фиксируют (фламбируют), проводя стекло – мазком вверх – 3–4 раза через пламя горелки, пока не появляется ощущение жжения при прикладывании стекла к тыльной стороне руки. Спиртовку после фиксации мазка следует потушить, накрыв колпачком.

4) Окрашивание. Фиксированный препарат помещают на подставку над чашкой, пипеткой мазок заливают раствором фуксина основного и выдерживают 2 мин. Следят за тем, чтобы во время окраски краситель не высыхал, и в случае необходимости наносят его новые порции. После окрашивания препарат промывают водой из колбы, держа стекло над чашкой, а затем предметное стекло снизу и сверху (не касаясь препарата) протирают фильтровальной бумагой для удаления воды. Препарат выдерживают на воздухе до полного высыхания

5) Микроскопирование. Предметное стекло с приготовленным препаратом помещают на предметный столик микроскопа таким образом, чтобы пучок света проходил через окрашенную зону, в которой находится мазок. На эту зону наносят каплю иммерсионного масла, в которую с помощью макромет-

рического винта, опуская тубус микроскопа, вводят объектив, имеющий черную риску (иммерсионный объектив). Эту операцию следует проводить очень осторожно, поскольку фронтальная линза иммерсионного объектива довольно слабо держится в оправе и при грубом обращении может сместиться. После погружения объектива в масло осторожно, также пользуясь макровинтом, поднимают тубус и, наблюдая в окуляр микроскопа, находят окрашенную плоскость препарата и проводят точную фокусировку объекта. Меняя поле зрения путем медленного перемещения предметного стекла, просмотреть препарат и найти наиболее хорошую зону с окрашенным объектом.

По окончании микроскопирования и после просмотра препарата преподавателем поднимают с помощью макровинта тубус микроскопа и осторожно протирают фронтальную линзу объектива мягкой салфеткой, смоченной бензином. Протирать объектив от иммерсионного масла другими растворителями, например, ксилолом или ацетоном, не рекомендуется, так как он может растворить состав, склеивающий линзы объектива. Предметные стекла с отработанными препаратами складывают в банку с дезинфицирующим раствором.

Объекты исследования: *Sarcina flava*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*.

Задания:

- 1) Приготовить препарат «мазок» из предложенных преподавателем чистых культур бактерий;
- 2) просмотреть приготовленные препараты под микроскопом с иммерсионным объективом, показать преподавателю;
- 3) оформить отчет по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. В каких пределах варьируются размеры бактериальных клеток?
2. Какие подвиды морфологии обладают кокки?
3. Объясните разницу между бациллами и клостридиями.
4. Почему клетки прокариот не могут быть таких размеров, как эукариотические?
5. Что такое «фламбирование»?

6. Опишите и изобразите в отчете принцип работы иммерсионной системы при световом микроскопировании.

7. Почему препарат «мазок» удобнее готовить с края предметного стекла?

Занятие 2. Клеточная стенка бактерий

Клеточная стенка (CW – от англ. cellular wall) является важным и обязательным компонентом для большинства прокариотических организмов. Она служит механическим барьером между протопластом и внешней средой и придает клетке определенную, присущую ей форму.

Тонкую структуру клеточной стенки хорошо видно в электронном микроскопе. Для наблюдения клеточной стенки в световом микроскопе применяют метод темного поля либо специальную окраску, с помощью которой удастся легко выявить границы между отдельными клетками, расположенными в виде длинных нитей или плотных агрегатов.

В 1884 г. Грамом был разработан метод комплексного окрашивания бактерий йодом с фиолетовым красителем. При последующей обработке клеток этиловым спиртом и промывке водой у одних видов бактерий (грамположительных) данный комплекс остается в клетке, и они окрашиваются в синий цвет, а у других (грамотрицательных) комплекс вымывается, и они обесцвечиваются. Способность или неспособность окрашиваться по Граму, что связано с различиями в строении клеточной стенки, является важным диагностическим признаком и позволяет разделить бактерии на две большие группы.

Исследование химического состава клеточной стенки показало, что ее основным компонентом является муреиновый комплекс (в современной литературе – пептидогликановый каркас), составляющий у грамположительных бактерий основную массу клеточной стенки, а у грамотрицательных около 10 % (рисунок 8). Муреиновый комплекс представлен гетерополимером пептидогликаном, построенным на основе чередующихся остатков ацетилглюкозамина и ацетилмуравовой кислоты, связанных β -1,4-гликозидной связью. Соседние молекулы пептидо-

гликана поперечно сшиты пептидной цепочкой, состоящей из четырех аминокислот: L-аланин, D-глутаминовая кислота, мезо-диаминопимелиновая кислота и D-аланин (рисунок 7).

Характерной особенностью данного пептида является то, что синтез его идет не на рибосомах, а при участии ферментов, и в состав его входят аминокислоты D-формы, редко встречающиеся в пептидах как у про- так и у эукариот. Таким образом, пептидогликан представляет собой одну гигантскую молекулу, сшитую при помощи гликозидных и пептидных связей.

У грамположительных бактерий (в современной литературе – фирмикутных) клеточная стенка состоит из мощного многослойного муреинового каркаса, а у грамотрицательных муреиновый комплекс однослойный. Другим отличием грамположительных бактерий является присутствие в составе клеточной стенки тейховых кислот, которые прочно связаны с муреиновым комплексом. Данные кислоты представляют собой полимеры, построенные на основе глицерина, и не входят в состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Данные группы микроорганизмов отличаются также и аминокислотным составом клеточной стенки.

У грамотрицательных бактерий (в современной литературе – грациликутных) кроме муреинового комплекса в составе клеточной стенки имеется белковый слой, включающий полный набор аминокислот, в то время как у грамположительных бактерий в составе клеточной стенки их не более четырех, поскольку именно четыре аминокислоты входят в пептидную цепочку муреинового комплекса (рисунок 8).

Отличительным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий является наружная мембрана (ОМ – от англ. out membrane). Она отличается от билипидной клеточной мембраны (СМ – от англ. cellular membrane) тем, что строение ее асимметрично: ОМ содержит в наружном липидном слое пептид А (или О-антиген) в качестве компонента липополисахарида. метаболически активная область между СМ и ОМ называется периплазматическим пространством или периплазмой, где содержатся специфические белки, олигосахариды и неорганические молекулы. Это дополнительный компартмент грамотрицательных бактерий.

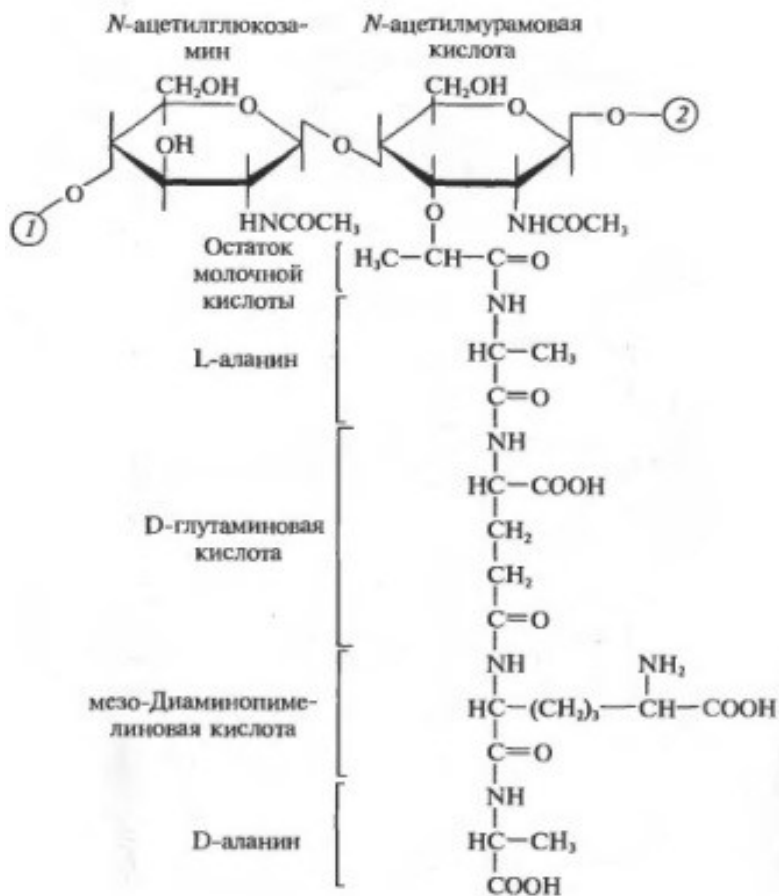


Рисунок 7. Структура молекулы муреина

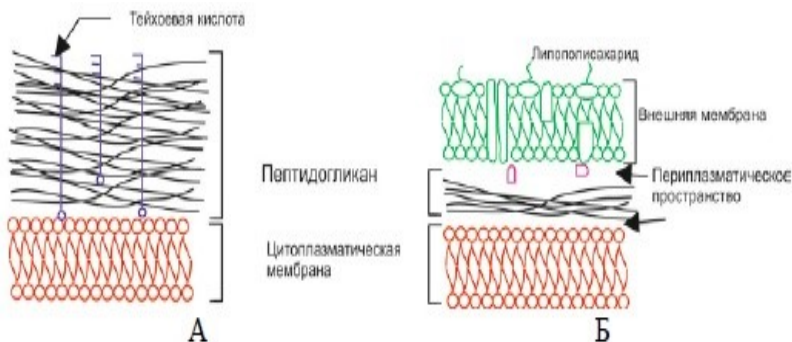


Рисунок 8. Клеточная стенка грамположительных (а) и грамотрицательных бактерий (б)

Белки периплазмы несут три ферментативных функции: гидролитическую и транспортную и синтетическую. Гидролитические ферменты расщепляют биополимеры до мономеров («функция лизосомы»), которые транспортными белками переносятся в цитоплазму. Синтетические белки периплазмы участвуют в пост-трансляционной модификации белков и синтезе некоторых компонентов клеточной стенки («функция эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи»). Так же периплазма участвует в регуляции осмотического давления клетки.

Химический состав и строение клеточной стенки определяют и такое свойство бактерий как кислотоустойчивость. Она обусловлена высоким содержанием в клеточной стенке миколовых кислот и присуща некоторым микобактериям. Для выявления данного свойства используют концентрированные растворы красок и нагревание. В результате такой обработки клетки приобретают окраску и не обесцвечиваются при последующем воздействии крепких растворов кислот и щелочей.

Функции клеточной стенки:

- 1) Защита от внешних воздействий;
- 2) транспорт веществ и выведение метаболитов;
- 3) клеточная стенка способна окрашиваться красителями, что определяет ее тинкториальную функцию;

4) компоненты клеточной стенки распознаются иммунной системой макроорганизма (антигенная функция);

5) рецепторная функция заключается в том, что на поверхности CW располагаются специфические белковые мишени для химических веществ, сигнальных молекул, бактериоцинов и бактериофагов;

6) клеточная стенка поддерживает определенную форму бактериальной клетки, являясь жестким каркасом.

Прокариоты, не имеющие клеточной стенки. Впервые бактерии, не имеющие клеточной стенки, были обнаружены при воздействии на них лизоцимом – ферментом из группы гликозидаз, содержащимся в яичном белке, слюнной жидкости и выделяемом некоторыми бактериями.

Бактерии с частично (сферопласты) или полностью (протопласты) утраченной клеточной стенкой можно получать при воздействии определенными химическими веществами в лабораторных условиях. При нарушении синтеза клеточной стенки бактерий под влиянием фермента лизоцима или пенициллина, а также защитных факторов организма образуются клетки с измененной, часто шаровидной, формой (протопласты).

После удаления ингибитора синтеза клеточной стенки такие измененные бактерии могут реверсировать, то есть приобретать полноценную клеточную стенку и восстанавливать исходную форму.

Бактерии сферопластного или протопластного типа, утратившие способность к синтезу пептидогликана под влиянием антибиотиков или других факторов, но сохранившие способность к размножению, называются L-формами. L-формы могут возникать и в результате мутаций. Они представляют собой осмотически чувствительные шаровидные, колбовидные клетки различной величины, в том числе и проходящие через бактериальные фильтры. L-формы могут образовывать многие бактерии – возбудители инфекционных болезней.

Приготовление препаратов

Окраска по Граму. На предметном стекле из предложенной для исследования культуры готовят мазок, который просушивают на воздухе и фиксируют в пламени горелки. Так как окраска по Граму у некоторых видов бактерий с возрастом может изменяться, для проведения этой методики всегда берут молодые односточные культуры. Далее препарат последовательно обрабатывают 1 %-ным раствором кристаллического (или генцианового фиолетового) и раствором Люголя по 2 мин каждым, не промывая мазок между сменой красителей. После окраски препарата двумя красителями его нужно промыть водой. Клетки грамположительных и грамотрицательных бактерий на этом этапе имеют одинаковый синий цвет.

Затем препарат, промытый водой, обрабатывают 96 %-ным этиловым спиртом, нанося его пипеткой на мазок или внося предметное стекло с препаратом в стакан с этиловым спиртом. После обработки спиртом препарат промывают водой. Поскольку данный этап является наиболее важным в осуществлении всей процедуры окраски по Граму, следует готовить не один, а несколько препаратов для каждой из исследуемых культур и варьировать время обработки препарата спиртом от 15 до 60 с (на каждую культуру делается по три препарата, обрабатываемые 15, 30 и 60 секунд, соответственно). Препараты на этом этапе следует проконтролировать под микроскопом. Клетки грамположительных бактерий будут иметь синий цвет, а грамотрицательные обесцвечены. *Важно!* На этом этапе контроля препараты микроскопируются в иммерсионной системе, чтобы масло не помешало дальнейшей окраске, для просмотра используется край предметного стекла. После просмотра масло стирают фильтровальной бумагой!

Если результат будет удовлетворительным, препарат докрасивают фуксином не более 30 с. Промытый и высушенный препарат просматривают под микроскопом, используя им-

мерсионный объектив. При этом клетки грамположительных бактерий будут иметь фиолетовый цвет, а грамотрицательные – розовый. (рисунок 9).

КОН-метод определения грамположительных и грамотрицательных бактерий состоит в том, что на предметное стекло наносят каплю 3 %-ного водного раствора КОН, в эту каплю петлей вносят исследуемую культуру бактерий и тщательно перемешивают.

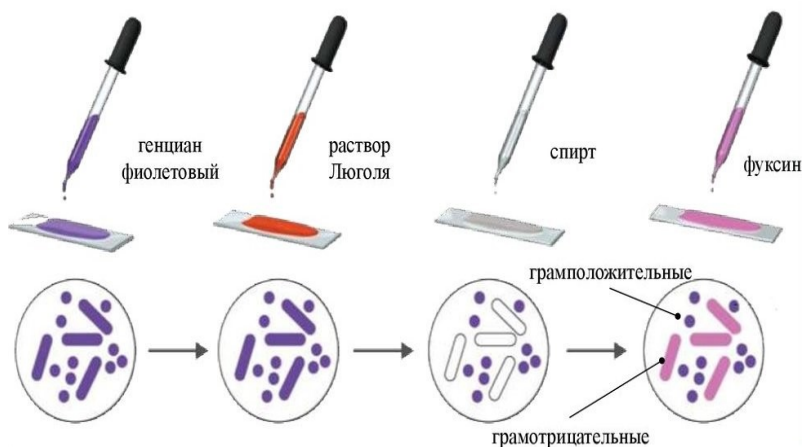


Рисунок 9. Методика окрашивания по Граму

Если за 60 с суспензия бактерий в КОН становится вязкой или желеобразной, то анализируемая культура является грамотрицательной, а если консистенция раствора не меняется – культура грамположительная. Данный метод является более быстрым, простым и дешевым и, следовательно, может быть успешно использован для быстрой идентификации вновь выделенных микроорганизмов.

Определение кислотоустойчивости по Циль-Нильсену. Данный метод получил наиболее широкое применение для выявления кислотоустойчивости бактерий. На предметном стекле готовят два мазка – исследуемых клеток и клеток кислотоустойчивых бактерий. Препараты высушивают на воздухе и фикси-

руют в пламени горелки. На мазки помещают полоски фильтровальной бумаги и заливают карболовым фуксином Циля, а затем препарат 2–3 раза подогревают до появления паров, держа стекло высоко над пламенем горелки. Глядя на мазок сбоку, наблюдают за появлением пара и, когда это происходит, тотчас препарат отставляют в сторону. Затем препарату дают остыть, снимают с него фильтровальную бумагу, промывают водой и обесцвечивают 5 %-ным раствором серной кислоты. Для этого предметное стекло с препаратом погружают 2–3 раза в стакан с кислотой или наносят кислоту пипеткой на мазок и выдерживают 5 с. Далее препарат обрабатывают спиртом 10 с, промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют под иммерсией. При строгом соблюдении режима окраски кислотоустойчивые клетки приобретают красный цвет, а некислотоустойчивые – синий. Данное свойство можно определять у клеток любого возраста.

Объекты исследования: *Escherichia coli*, *Sarcina flava*, *Bacillus megaterium*.

Задания

1. Провести окраску бактерий по Граму в три этапа:
 - а) обработка комплексом красителей и промывка водой;
 - б) обработка спиртом и промывка водой;
 - в) обработка фуксином и промывка водой;

Приготовленные препараты каждого из этапов просмотреть под микроскопом и результаты наблюдений зарисовать в тетради.

2. Провести идентификацию грамположительных и грамотрицательных бактерий используя КОН- метод.

3. Провести идентификацию бактерий на кислотоустойчивость по Циль-Нильсену.

4. Оформить отчет по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Из каких чередующихся мономеров состоит гетерополимер пептидогликан?
2. Назовите особенности поперечной пептидной сшивки в составе пептидогликана.

3. Опишите отличия клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий.
4. Каковы функции периплазматического пространства?
5. Чем отличаются ОМ и СМ?
6. Предположите, почему после обработки спиртом грамотрицательные клетки теряют окраску, а грамположительные – нет.
7. Почему при использовании КОН-метода суспензия грамотрицательных клеток становится желеобразной?

Занятие 3. Движение бактерий

Ученых всегда восхищала подвижность простых организмов, таких, как бактерии. Действительно, бактерии – весьма привлекательный объект для изучения подвижности и связанных с ней проблем: их клеточная организация относительно проста (по сравнению с клетками эукариот). Биохимические процессы их достаточно изучены; кроме того, они быстро и в больших количествах размножаются, так что представляют собой идеальную систему для изучения биологических проблем.

Системы, предназначенные для обеспечения подвижности у эукариотических организмов, имеют сложную структуру, однако у всех изученных клеток они построены из удивительно похожих элементов. Компоненты систем подвижности могут, очевидно, приспосабливаться к любым ситуациям. Сходство в строении основных компонентов подвижности указывает на то, что они кодируются генами, которые сохранились неизменными на протяжении всей клеточной эволюции.

По морфологическим свойствам и по белковому составу все структуры, создающие движение у эукариотических клеток, можно отнести к двум основным системам. Первая система строится из микротрубочек, основной компонент которых – тубулин, вторая – из микрофиламентов, содержащих главным образом актин. Эти две системы ответственны за различные типы движения. Микротрубочки связаны с движением ресничек и жгутиков, микрофиламенты – с амебоидным движением.

Наиболее распространенным типом движения бактерий является поступательное движение, осуществляющееся с помощью жгутиков. Расположение жгутиков на поверхности клетки может быть различным (рисунок 10). Если жгутики находятся у полюсов или в полярной области, то имеет место полярное или субполярное расположение, если вдоль боковой поверхности, то говорят о латеральном расположении. В зависимости от числа жгутиков и их локализации на поверхности клетки различают монополярные монотрихи, монополярные политрихи, биполярные монотрихи, биполярные политрихи и перетрихи.



Рисунок 10. Основные типы расположения жгутиков у бактерий:
1 – монополярный монотрих, 2 – монополярный политрих, 3 – биполярный монотрих, 4 – биполярный политрих (амфитрих), 5 – перитрих (лофотрих)

Строение жгутика. Жгутик бактерий состоит из трех главных частей (рисунок 11). Основную массу жгутика (до 95 %) составляет длинная спиральная нить – тело жгутика. У большинства бактерий нить состоит только из одного белка – флагеллина. Белковые субъединицы уложены в виде спирали, внутри которой имеется полый канал. У поверхности клеточной стенки нить переходит в изогнутую структуру – крюк, который представляет собой цилиндр, диаметром большим или равным диаметру нити (20 нм), выполняющий функцию гибкого сочленения с базальным телом. Базальное тело представляет собой систему из двух или четырех колец, нанизанных на стержень, являющийся продолжением крюка.

Два внутренних кольца (М и S) являются обязательными структурами базального тела, тогда как наружные кольца (Р и L) отсутствуют у грамположительных бактерий, и, следовательно,

не принимают участия в движении. М-кольцо локализовано в цитоплазматической мембране, а S-кольцо располагается в периплазматическом пространстве грамотрицательных или в пептидогликановом слое грамположительных бактерий. Кольца Р и L у грамотрицательных бактерий локализованы соответственно в пептидогликановом слое и в наружной мембране. Функция этих колец сводится к тому, чтобы обеспечить наилучшее крепление стержня, проходящего через клеточную стенку грамотрицательных бактерий, в то время как у грамположительных эту функцию выполняет многослойный жесткий пептидогликановый мешок.

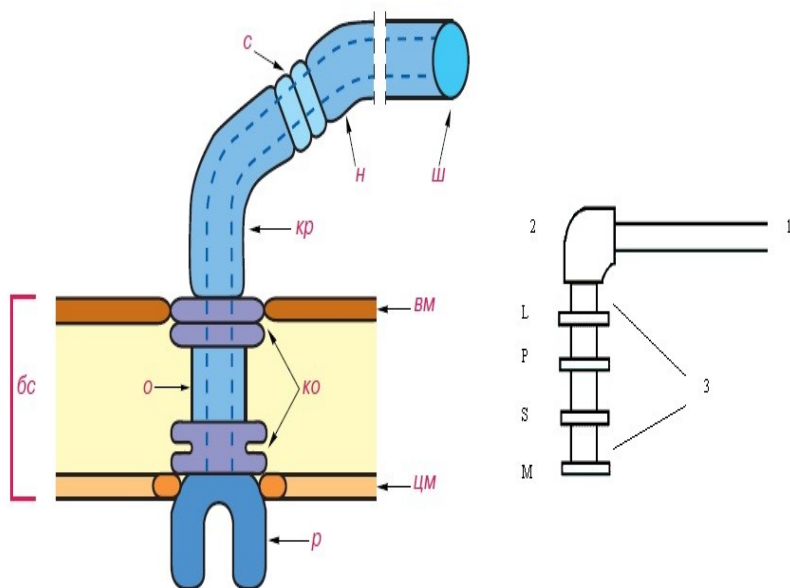


Рисунок 11. Схема строения бактериального жгутика: бс – базальная структура, в м – внешняя мембрана, ц м – цитоплазматическая мембрана, р – ротор, о – ось, ко – кольца жгутикового мотора (М, S, Р, L), кр – крюк, с – цилиндрики - соединители, н – нить жгутика, ш – шапочка. 1 – нить, 2 – крюк, 3 – базальная структура с кольцами.

Электрохимический протонный градиент как движущая сила вращения жгутика. Для работы жгутикового мотора необ-

ходима энергия трансмембранного электрохимического протонного градиента, причем обе его составляющие – электрическая и концентрационная поддерживают движение бактерий, которое прекращается при добавлении в среду протонофорных разобщителей, устраняющих трансмембранный протонный градиент.

Механизм образования электрохимического протонного градиента удобно рассмотреть на примере фототрофной бактерии *R. rubrum*, поскольку цитоплазматическая мембрана данных бактерий имеет систему дыхания и сопряженную с ней фотосинтетическую систему переноса электронов (рисунок 12).

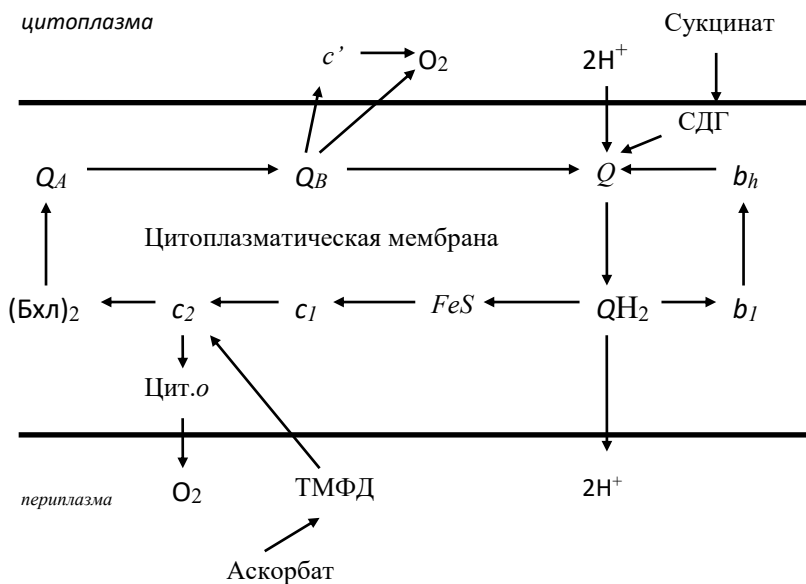


Рисунок 12. Взаимодействие фотосинтетической и дыхательной систем переноса электронов в цитоплазматической мембране несерной пурпурной бактерии *Rhodospirillum rubrum*. (Бхл)₂ – бактериохлорофильный димер реакционного центра; Q_A и Q_B – первичный и вторичный хинон реакционного центра; Q и QH_2 – окисленная и восстановленная форма хинона мембранного фонда; b_H и b_L – высокопотенциальный и низкопотенциальный гем цитохрома b ; c_2 и c_1 – цитохром c_2 и c_1 ; цит. o – цитохромоксидаза; FeS и c_1 – FeS-белок Риске и цитохром c_1 , входящие в состав bc_1 – комплекса; СДГ – сукцинатдегидрогеназа (сукцинат- CoQ -редуктаза), ТМФД – тетраметил- p -фенилендиамин

В темноте, в результате окисления сукцината, выполняющего роль донора электронов, происходит трансмембранный перенос водорода. При этом протон выводится из клетки в окружающую среду, а электрон поступает на цитохром c_2 , который является общим компонентом системы дыхания и фотосинтетической системы переноса электронов. Далее от цитохрома c_2 электрон при участии цитохромоксидазы, роль которой выполняет цитохром o , передается на кислород. В результате восстановления кислорода образуется вода, что сопровождается связыванием протона из цитоплазмы клетки. Таким образом, в результате окисления сукцината в системе дыхания на цитоплазматической мембране возникает электрохимический протонный градиент.

На свету же электрон от цитохрома c_2 передается на бактериохлорофилл реакционного центра и далее – в систему циклического переноса электронов. Преобразование световой энергии в электрическую протекает в реакционном центре, компоненты которого расположены трансмембранно, при этом происходит перенос электрона от фотовозбужденного бактериохлорофилла реакционного центра на первичный стабильный акцептор хинонной природы (Q_A).

В дальнейшем электрон от акцептора Q_A передается на вторичный акцептор Q_B , роль которого выполняет рыхлосвязанный хинон, а бактериохлорофилл восстанавливается в результате принятия электрона от цитохрома c_2 . Второй электрон молекула хинона принимает от цитохрома b_h . В результате принятия двух электронов идет и последовательное связывание из цитоплазмы клетки двух протонов. В протонированной форме хинон пересекает цитоплазматическую мембрану и на противоположной стороне мембраны последовательно окисляется бактериохлорофиллом реакционного центра и цитохромом b_L . В результате окисления хинона идет выброс двух протонов в окружающую среду. Особенностью данной циклической системы переноса электронов является возможность ее функционирования в анаэробных условиях в отсутствии доноров электронов.

Таким образом, функционирование фотосинтетической электронтранспортной системы, как и системы дыхания, приво-

дит к созданию по обе стороны цитоплазматической мембраны протонного градиента, который служит движущей силой процесса фотофосфорелирования и движения бактерий.

Механизм работы жгутикового мотора. Гипотетическая модель работы жгутикового мотора была предложена В. П. Скулачевым. Согласно этой модели вращение жгутика определяется вращением М-кольца, содержащего по периферии пояска из NH_2^- групп (рисунок 13).

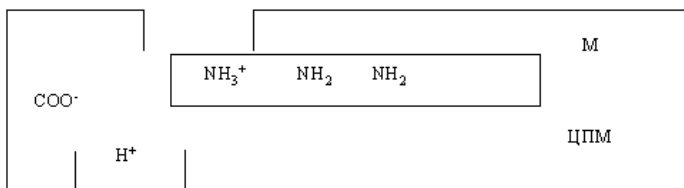


Рисунок 13. Модель работы протонного мотора базальной структуры жгутика: М – кольцо, ЦПМ – цитоплазматическая мембрана бактериальной клетки

Любая бактерия может существовать, если на ее мембране функционирует протондвижущая сила, заставляющая протоны заходить внутрь клетки. Протондвижущая сила обеспечивается разностью концентраций протонов на внешней и внутренней сторонах мембраны (на внешней стороне их больше, потому что работают дыхательная и (или) фотосинтетическая электронтранспортная цепь) и наличием более отрицательного заряда на внутренней стороне мембраны. Встроенное в цитоплазматическую мембрану М-кольцо с NH_2^- группами (подвижный ротор мотора), окружено трансмембранными белками, содержащими отрицательно заряженные COO^- -группы – это статор мотора. Протондвижущая сила заставляет протоны проходить через М-кольцо внутрь клетки, при этом Протонирование NH_2 приводит к электростатическому притяжению между созданной в данный момент времени NH_3^+ -группой ротора и COO^- -группами статора. Поскольку NH_3^+ прикреплена к кольцу М, то оно поворачивается, чтобы сблизить NH_3^+ - и COO^- -группы.

Вращение М-кольца приводит к перемещению следующей аминокислоты к верхнему протонному пути. Протонирование COO^- сопровождается выбросом H^+ через нижний полуканал в цитоплазму клетки. Число транслоцирующих протонов за один оборот диска равен количеству $-\text{NH}_2$ -групп ($=10^3$). Установлено, что для полного оборота кольца через базальную структуру должно пройти 500 – 1000 протонов. Вращение кольца через плотно связанную с ним ось и крюк передается нити жгутика, которая функционирует как пропеллер или корабельный винт. Скорость вращения кольца достигает 300 оборотов в секунду.

Какие виды движения обеспечивает жгутик? Если бактерия находится в жидкой среде, то жгутик помогает ей плыть. *Плавание* – это самый быстрый способ передвижения. Причем, бактерия может неплохо управлять своим движением, меняя направление вращения базального тела: вращение базального тела по часовой стрелке толкает клетку в направлении от жгутика, а биения против часовой стрелки тянут клетку вслед за жгутиком.

Подсчитано, что плыть целенаправленно в одном направлении бактерия может не более 3 секунд, затем удары окружающих молекул в следствие броуновского движения, разворачивают ее в случайном направлении, поэтому бактерии разработали собственную стратегию плавания. Когда нить жгутика вращается против хода часовой стрелки, бактерия движется приблизительно по прямой, эта стадия движения называется «пробег». Скорость перемещения в этот период 20 – 80 мкм/сек. Например, кишечная палочка плывет 30 мкм/сек, нетрудно рассчитать, что за час она могла бы преодолеть дистанцию всего лишь в 10 см. Много ли это? Длина клетки кишечной палочки 1,7 мкм, что в миллион раз меньше роста среднего роста человека. Если бы мы двигались относительно длины своего тела с такой же скоростью, что и бактерия, то развивали бы скорость 100 км/час.

После пробега наступает стадия движения «кувырок», когда мотор 0,1 сек вращается по ходу часовой стрелки. Чередование «пробегов» и «кувырков» создает целенаправленное движение бактерий, именуемое *таксис*. В зависимости от движения бактерий, к фактору или от него, выделяют положительный и

отрицательный таксисы. Вещества, вызывающие положительный таксис называют аттрактантами, а отрицательный – репеллентами. По природе действующего фактора различают хемотаксис, фототаксис, вискозитаксис, магнитотаксис и др. Чтобы распознавать сигналы из внешнего мира, бактерия синтезирует специальные белки – рецепторы, которые располагаются у нее на поверхности. Каждый вид рецепторов реагирует на свой стимул – молекулы еды, свет и так далее. Обнаружив свой стимул, рецептор передает сигнал о нем внутрь клетки.

Но сигнал, передаваемый рецептором, говорит только о том, что желанный объект есть где-то рядом, но не сообщает, с какой именно стороны от бактерии он находится. И чтобы найти еду, бактерии приходится хитрить. Почуввав пищу, бактерия плывет несколько миллисекунд с помощью жгутика в случайном направлении. Если во время движения сигнал ослабевает, бактерия резко останавливается, делает «кувырок» и пробует плыть в другую сторону. Если в этот раз сигнал от пищи усиливается, то бактерия проплывает в эту сторону большее расстояние «пробегом». Чем ближе аттрактант, тем меньше бактерия совершает «кувырков» и увеличивает время «пробегов». Таким образом, почти что играя в «горячо-холодно», бактерия достигает цели.

А теперь представьте размахивание жгутиками на твердой поверхности, смоченной жидкостью. Бактерии будут не плыть, а расползаться в одной плоскости. Такое движение называется *роением*. Роение чаще бывает у бактерий, живущих в крупных колониях, – подвижные бактерии, находящиеся с краю, пытаются отодвинуться как можно дальше и основать свои собственные колонии.

Бактерии могут также создавать более короткие и просто устроенные нити, чем жгутики, – пили, образованные белком папиллином. Клетка может с помощью пили прикрепиться к чему-нибудь твердому, а потом подтянуться к месту крепления, разбирая эту нить, начиная от места крепления пили к клетке. Можно сказать, что клетка перемещается рывками. Подобный способ движения у одной клетки называется *твичинг* (англ. *twitch* – дергать, тащить). А если так действует несколько скрепленных друг с другом бактерий, то они по твердой поверхности перемещаются *скольжением*.

Приготовление препаратов

Для окрашивания жгутиков предложено несколько методов, общим этапом для которых является протравливание препарата (обычно растворами таннина, $KAl(SO_4)_2$, $HgCl_2$) и последующая окраска (чаще карболовым раствором фуксина). В результате этого на жгутиках происходит осаждение красителя, благодаря чему одновременно достигается как увеличение их толщины, так и уменьшение прозрачности.

Одним из предложенных методов окрашивания жгутиков является метод Лейфзона.

1. Выращенные на твердой питательной среде бактерии, осторожно ресуспендируют в стерильной воде. Бактериальной петлей суспензию наносят на предметное стекло и высушивают на воздухе.

2. Восковым стеклоглафом очерчивают вокруг бактериальной пленки прямоугольник.

3. Наносят на предметное стекло 1 мл раствора красителя таким образом, чтобы он не вытекал за пределы восковой линии. Оставляют краситель на определенное время (до 1 часа). В состав красителя входят 1,5 % хлористого натрия, 3 % таннина (дубильной кислоты) и 0,03 % фуксина.

4. Как только на поверхности красителя образуется золотистая пленка, а по всему мазку выпадет осадок, краситель удаляют под струей воды, а препарат высушивают на воздухе.

5. Препарат микроскопируют с иммерсионной системой.

Клетки бактерий окрашиваются в красный цвет, жгутики принимают вид толстых нитей, отходящих от клетки.

Метод Леффлера

1. Суспензию бактерий вносят в каплю воды на предметно и сушат при комнатной температуре.

2. Препарат фиксируют однократным проведением через пламя горелки.

3. Препарат обрабатывают протравителем в течение 3 – 5 минут, нагревая над пламенем горелки до появления пара, после чего промывают дистиллированной водой.

4. Высушенный после промывки препарат окрашивают карболовым фуксином Циля, 3 – 5 минут, нагревая над спиртовкой до появления пара.

5. Препарат микроскопируют с иммерсионной системой.

Клетки и жгутики бактерий окрашиваются в розовый цвет.

Для определения подвижности используют прижизненные препараты бактерий.

Раздавленная капля. Для приготовления данного препарата на предметное стекло наносят каплю воды и помещают в нее небольшое количество молодой культуры микроорганизмов, размешивают и накрывают покровным стеклом. Культуру, выращенную на плотной питательной среде, переносят в каплю воды микробиологической петлей, культуру, выращенную в жидкой среде, – стерильной пипеткой или стеклянной палочкой. В этом случае каплю воды на предметное стекло можно не наносить. Капля исследуемого материала должна быть небольшой, чтобы после прижимания ее покровным стеклом не было избытка жидкости, выступающей из-под него. В противном случае избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Готовый препарат помещают на предметный столик микроскопа и рассматривают его под иммерсией, предварительно нанеся в центр покровного стекла каплю иммерсионного масла.

При наблюдении под микроскопом можно заметить активное движение бактерий, которые перемещаются в разных направлениях с разной скоростью. Не следует путать самостоятельное движение бактерий с броуновским движением в воде мельчайших частиц, вызывающих беспорядочные колебания клеток на одном месте. Движение бактерий не следует также путать с чисто механическим движением, когда с током жидкости все частицы, находящиеся в ней, передвигаются в одном направлении с одинаковой скоростью.

Для изучения механизма движения бактерий следует провести опыты с протонофорным разобщителем (10^{-6}) и соляной кислотой (5 %-ный раствор). Для этого на стык покровного и предметного стекол стеклянной палочкой наносят каплю разобщителя, который устраняет электрохимический протонный градиент на мембране, что приводит к прекращению движения

бактерий. Если после прекращения движения в среду аналогичным образом внести соляную кислоту, что создает искусственный протонный градиент, то клетки вновь начнут двигаться.

После окончания наблюдений поднимают тубус микроскопа, препарат снимают с предметного столика и помещают в сосуд с дезинфицирующей жидкостью, а объектив протирают бензином.

Висячая капля. Для приготовления этого препарата каплю клеточной суспензии наносят в центр покровного отекла, которое переворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с лункой в центре. Капля должна свободно висеть, не касаясь краев и дна лунки. Края лунки предварительно смазываются вазелином. Капля оказывается герметизированной во влажной камере, что позволяет вести многодневные наблюдения за объектом. Полученный препарат микроскопируют. Для этого на поверхность покровного стекла наносят каплю иммерсионного масла и под контролем глаза сбоку опускают в нее объектив, не касаясь покровного стекла. Затем, наблюдая в окуляр, медленно поднимают тубус микроскопа до получения ясного изображения. После просмотра препарата стекла кладут в дезинфицирующий раствор, а объектив протирают.

Препарат отпечаток. Из агаризованной среды, на которой микроорганизмы растут сплошным газоном, вырезают скальпелем небольшой кубик и переносят его на предметное стекло так, чтобы поверхность с микроорганизмами была обращена вверх. Затем к колонии прикладывают чистое покровное стекло, слегка придавливают его и тотчас же снимают, стараясь не сдвинуть в сторону. Полученный препарат помещают в каплю воды на предметное стекло. Отпечаток можно получить и на предметном стекле, если касаться им поверхности колонии. В качестве объекта исследования для приготовления данного препарата может быть использован свежий сыр. Для этого небольшой кусок сыра сдавливают между двумя предметными стеклами. Затем сыр убирают, на отпечаток наносят каплю воды, накрывают покровным стеклом и микроскопируют под иммерсией.

Определение интенсивности роения (скольжения). В середину чашки Петри с агаризованной питательной средой нано-

сится 3 мкл суспензии исследуемой культуры с известной оптической плотностью. Чашки обертываются пленкой и помещаются в термостат и культивируются при 37° в течение 40 часов. Затем пленка снимается, а чашки убираются в холодильник. На следующем занятии измеряется диаметр роящейся (или скользящей) колонии предложенных для анализа чистых культур.

Объекты исследования: *Clostridium sp.*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Rhodospirillum sp.*

Задания

1. Приготовить препарат для идентификации наличия жгутика методом, предложенным преподавателем.
2. Приготовить препарат «раздавленная капля» и провести опыты с разобшителем и соляной кислотой. На основе наблюдений сделать выводы.
3. Приготовить препарат «висячая капля», используя ту же культуру бактерий.
4. Приготовить препарат «отпечаток», используя культуры бактерий на твердой питательной среде и сыр.
5. Заложить чашки Петри для определения интенсивности роста у бактерий *Clostridium sp.*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (анализ результатов на следующем занятии).
6. Оформить отчет по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Какие белковые структуры обеспечивают движение у про- и эукариот?
2. Из каких основных частей состоит жгутик бактерий?
3. Какое кольцо базальной структуры жгутика обеспечивает его движение?
4. Для чего внутри бактериального жгутика имеется полость?
5. Опишите механизм создания протонного градиента у *Rhodospirillum rubrum*.
6. Как бактерия движется в направлении аттрактантов?
7. Какие способы движения существуют у бактерий помимо плавания?

Занятие 4. Капсулы и слизистые чехлы

Снаружи клеточная стенка бактерий может быть окружена слизистым веществом (в современной литературе – экзополисахаридные структуры). В зависимости от его толщины и консистенции различают макро- и микрокапсулы, а также слизистые чехлы. Под капсулой понимают слизистое образование, имеющее четко очерченную поверхность и прочную связь с клеточной стенкой. Если толщина слизистого образования меньше 0,2 мкм и, следовательно, оно может быть обнаружено только с помощью электронного микроскопа, то его следует отнести к микрокапсуле, если больше 0,2 мкм, то – к макрокапсуле, которую можно видеть в обычный световой микроскоп. Если же окружающее клетку слизистое вещество имеет аморфный, бесструктурный вид и легко отделяется от поверхности клетки, то его определяют как слизистый чехол. Между этими тремя структурами у бактерий обнаружено много переходных форм.

Наличие капсул зависит от штамма микроорганизма и условий его культивирования. Некоторые бактерии, образующие капсулу, могут легко, в результате мутации превращаться в бескапсульные формы (R-формы). Наличие или отсутствие капсулы можно обнаружить невооруженным глазом по морфологии колоний, образующихся на твердой среде. Колонии, состоящие из клеток, окруженных капсулами (S-формы), имеют гладкую поверхность, а колонии, сформированные из бескапсульных клеток, – шероховатую.

Изучение строения капсул показало, что они имеют многослойную упорядоченную ультраструктуру, которая в свою очередь, имеет фибриллярное строение. Фибриллы, формирующие отдельные слои капсул, могут быть расположены параллельно или перпендикулярно клеточной стенке. Капсулы содержат некоторые компоненты, одинаковые с клеточной стенкой, и поэтому их в какой-то степени можно рассматривать как производные клеточной стенки. Однако химический состав капсулы и клеточной стенки не идентичны. Основными химическими компонентами капсул большинства бактерий являются полисахариды гомо- или гетерополимерной природы.

В первом случае они построены из сахарного остатка одного типа, во втором – из различных сахарных остатков.

Капсулы не являются обязательными структурами клетки, так как отсутствие их не приводит к нарушению клеточной активности. Однако капсулы выполняют определенные функции, полезные для клетки:

Аккумулирующие функции состоят в концентрации неорганических ионов и низкомолекулярных органических субстратов вблизи клеточной поверхности.

Защитные функции состоят в предохранении клетки:

- от высыхания;
- от антибактериальных агентов (кислот, щелочей, ионов тяжелых металлов, антибиотиков и пр.);
- от компонентов иммунной системы макроорганизма (комплемента, антител, макрофагов);
- от бактериофагов;
- от хищных бактерий и фаготрофных протистов.

Адгезионные функции состоят в том, что экзополисахаридные структуры служат одним из факторов клеточной адгезии, а также цементирующим веществом и обеспечивают:

- взаимную агрегацию бактерий данного вида и их агрегацию с другими членами микробиоты;
- прикрепление бактерий к субстрату.

Приготовление препаратов

Методика окраски капсул в негативном препарате. Это самый распространенный метод выявления экзополимерных структур у бактерий.

а) нанести на предметное стекло немного культуры (1) и каплю туши (2) на расстоянии примерно одной трети от края; 30;

б) правой рукой приставляют шлифованное стекло узким краем к стеклу слева от капель под углом 45°;

в) продвигают шлифованное стекло вправо до соприкосновения с каплей;

г) затем быстрым движением справа налево делают мазок. Капля должна быть небольшой и соразмерена так, чтобы весь мазок помещался на стекле, не доходя 1–1,5 см до его края;

д) нельзя прекращать размазывание и отнимать стекло раньше, чем капля будет исчерпана. Мазок высушить на воздухе и микроскопировать в иммерсионной системе (рисунок 14).

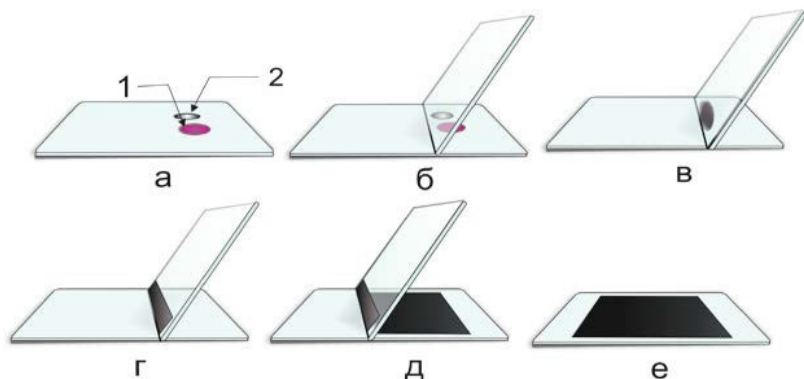


Рисунок 14. Приготовление мазка в негативном препарате
(пояснения в тексте)

Окраска капсул по методу Гинса. На конец предметного стекла петлей наносят каплю черной туши, добавляют клетки, перемешивают и ребром покровного стекла делают мазок по всей поверхности стекла. Мазок высушивают на воздухе и фиксируют. Далее мазок окрашивают карболовым фуксином 3 мин, промывают водой, вновь высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. На темно-сером фоне препарата видны розовые клетки бактерий, окруженные бесцветными капсулами.

Окраска капсул по методу Мисена. Готовят мазок, высушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки и красят раствором метиленового синего 3 мин, подогревая до появления пара. Препарат охлаждают, промывают водой, подсушивают и микроскопируют. Капсулы окрашиваются в светло-розовый цвет, бактерии в темно-синий.

Окраска капсул по Антони. Готовят мазок, высушивают его на воздухе, красят 2 мин 1 %-ным раствором кристаллического фиолетового, промывают 2 %-ным раствором медного купороса, подсушивают и микроскопируют. В поле зрения на се-

ром фоне препарата капсулы остаются неокрашенными, а бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет.

Объекты исследований: *Bacillus subtilis*, *Sarcina flava*, *Escherichia coli*.

Задания

1. Из предложенных культур приготовить препараты для выявления капсул разными методами.
2. Просмотреть под микроскопом и зарисовать.
3. Оформить отчет по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Чем отличаются микро-, макрокапсулы и слизистые чехлы?
2. Что такое R- и S- формы бактерий?
3. Опишите основные функции экзополисахаридных структур.
4. Опишите методику приготовления мазка в негативном препарате

Занятие 5. Споры бактерий

Бактерии рода *Bacillus*, *Clostridium* и *Plectridium* так же как отдельные кокки и спириллы, способны образовывать споры (эндоспоры) – тельца сферической или эллиптической формы, устойчивые к воздействию неблагоприятных факторов. Как правило, внутри бактериальной клетки образуется только одна спора. Однако в последнее время у отдельных видов *Clostridium* обнаружены клетки с двумя и более спорами. Обычно спорообразование начинается, когда бактерии испытывают недостаток питательных веществ, или когда в среде в большом количестве накапливаются продукты обмена веществ бактерий. Поэтому споры можно рассматривать как приспособление организма для выживания в неблагоприятных условиях среды.

Таким образом, можно сделать вывод, что споры бактерий – уникальные по структуре и свойствам образования, не имеющие аналогов по степени устойчивости к неблагоприятным факторам среды. Формирование спор зависит от условий

роста. Споры могут оставаться живыми в условиях, когда вегетативные клетки, то есть клетки, не образующие споры, погибают. Для уничтожения спор требуется температура пара 120°C при давлении его 1 атм. При этих условиях споры погибают через 20 мин.

Общая схема спорообразования может быть представлена в следующем виде. В результате деления бактериальной клетки, сопровождающегося выпячиванием цитоплазматической мембраны, наблюдается обособление двух протопластов, при этом один из них накрывается другим.

Дальнейшее развитие споры заключается в образовании нескольких слоев споровых покровов и ее созревании. Диаметр споры приблизительно равен диаметру клетки, в которой она образовалась, или несколько превышает его. Споры имеют вид плотных сильно преломляющих свет телец овальной или сферической формы. В зависимости от расположения спор клетки имеют различную форму. Споры могут образовываться в центре клетки, не вызывая изменение ее формы, – бациллярный тип; в центре клетки и изменять ее форму – клостридиальный тип; на конце клетки, придавая ей вид барабанной палочки, – плектридиальный тип.

После созревания споры клеточная стенка вегетативной части клетки разрушается, и спора выходит в окружающую среду. При попадании в благоприятные условия спора начинает прорастать. Споры бактерий могут длительное время (десятки, сотни и даже тысячи лет) существовать в покоящемся состоянии.

Приготовление препаратов

Споры обладают многослойными труднопроницаемыми оболочками, поэтому при простой обработке препарата спорообразующих бактерий фуксином или генциановым фиолетовым споры не окрашиваются, а обнаруживаются в клетках в виде бесцветных включений. Для окраски спор используют специальные сложные методы.

Метод Пешкова. На предметном стекле готовят мазок исследуемой культуры, высушивают на воздухе, фиксируют в

пламени горелки и заливают раствором метиленового синего по Леффлеру. Краситель доводят до кипения, держа предметное стекло над пламенем горелки. По мере испарения красителя добавляют новые его порции. Продолжительность окраски с момента закипания – 20с. Затем предметное стекло охлаждают, препарат промывают водой, что вызывает обесцвечивание цитоплазмы, и докрашивают 30 с 0,5 %-ным водным раствором нейтрального красного. Вновь промывают водой, подсушивают и микроскопируют под иммерсией. При правильном окрашивании клетки имеют красный, а споры – синий цвет.

Метод Ауески. На приготовленный высушенный мазок наливают 1–2 %-ный раствор соляной кислоты и подогревают на пламени до появления паров (3–4 раза). Промывают водой, высушивают и фиксируют над пламенем. Окрашивают через фильтровальную бумагу раствором фуксина при нагревании (до появления паров) в течение 3–5 мин. Препарат обесцвечивают 5 %-ным раствором серной кислоты в течение нескольких секунд (16–18 с) (до бледно-розовой окраски). Промывают водой и дополнительно окрашивают метиленовым синим в течение 2 мин. Промывают водой и высушивают. Микроскопируют с иммерсионной системой. При микроскопии видны споры (красные) и вегетативные клетки (синие).

Метод Шеффера-Фултона. Препарат, фиксированный в пламени горелки, заливают на 7 – 10 минут 7,5 % раствором маляхитового зеленого. Окрашивание проводят с подогревом, помещая препарат над сосудом с кипящей водой. По окончании окраски предметное стекло охлаждают, промывают препарат водой и докрашивают клетки 0,25 % водным раствором сафранина в течение 1 – 2 минут. Споры окрашиваются в зеленый цвет, клетки – в розовый.

Препарат «микрокультура» (или «агаровая пленка»). Это способ выращивания микроорганизмов на предметном стекле, что позволяет вести микроскопическое наблюдение за процессами роста и развития микроорганизмов, цикл развития и способность к эндоспорообразованию.

На тонкое нагретое предметное стекло наносят стерильной нагретой пипеткой 0,3 мл стерильной питательной

среды и распределяют по всей поверхности. После застывания среды удаляют петлей весь лишний агар, оставляя два тонких участка пленки величиной с покровное стекло каждый. В центр квадратов петлей наносят каплю суспензии клеток микроорганизмов. Стекло помещают во влажную камеру (чашка Петри со слоем влажной фильтровальной бумаги), которую ставят в термостат. Перед микроскопированием на пленку выросшей культуры наносят каплю необходимого красителя и накрывают покровным стеклом.

Для выявления спор на пленку питательной среды наносят суспензию исследуемых бактерий, культивируют как описано выше при 37°C 20 – 24 часа. Перед микроскопированием препарат подкрашивают метиленовым синим по Леффлеру и накрывают покровным стеклом. Микроскопируют под иммерсией, наблюдая край колонии. Этим методом можно наблюдать клетки в разных стадиях спорообразования.

Объекты исследования. Грамположительные бактерии рода *Bacillus*, *Clostridium* и *Plectridium*.

Задания

1. Приготовить по данным методикам препараты из предложенных культур на выявление спор.
2. Просмотреть под микроскопом и зарисовать.
3. Оформить отчет по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Типы спорообразования.
2. Формирование споры.
3. Роль спор в жизни бактерий.

Занятие 6. Запасные вещества и морфология дрожжей

Многие микроорганизмы в определенных условиях образуют запасные вещества, которые обнаруживаются в клетке в виде гранулярных цитоплазматических включений. Накопление их в клетке происходит в условиях избыточного содержания, прежде всего энергетических субстратов в среде.

Поэтому важнейшей функцией запасных веществ является энергетическое обеспечение синтеза индуцибельных ферментов в период адаптации клеток к меняющимся условиям окружающей среды. Природа запасных веществ может быть различна, но чаще всего это полисахариды, липиды, полифосфаты или молекулярная сера.

Липидные гранулы. У дрожжей запасные липиды представлены нейтральными жирами, которые легко обнаруживаются в живых клетках без специальных методов окраски в виде сильно преломляющих свет капель. Бактерии в качестве резервных липидов синтезируют поли- β -оксисаляную кислоту (ПОМ), которая образует округлые или продолговатые гранулы, окруженные белковой мембраной. С мембраной связаны ферменты синтеза и распада ПОМ. Важным фактором, способствующим накоплению ПОМ у разных бактерий, является увеличение концентрации питательных веществ в среде – глюкозы, пировата, а также лимитирование экзогенного источника азота. В некоторых случаях ПОМ может составлять до 80 % массы клеток. Распад гранул ПОМ наблюдается в средах, обедненных источником энергии и углерода, и связан с ферментативным гидролизом полимера, в результате которого образуются мономеры β -оксисаляной кислоты. В дальнейшем эта кислота преобразуется в ацетат, который метаболизируется через цикл трикарбоновых кислот.

Гранулы углеводной природы (полисахариды) являются производными глюкозы и представлены крахмалоподобными веществами – гранулезой и гликогеном. Их накопление стимулируется недостатком азота при избытке источника углерода и энергии и может достигать 50 % массы клетки. При обеднении среды данные полисахариды могут служить источником углерода и энергии для развития бактерий.

Полифосфаты (волютин), накапливаясь в клетке, образуют овальные гранулы. Они представляют собой запас фосфора, который может быть использован клеткой. Особенно энергичное накопление волютина происходит при перенесении бактерий из среды, лимитированной по фосфату, в среду, богатую ими.

Дрожжи являются наиболее удобными объектами исследований по выявлению запасных питательных веществ. Дрожжи

представляют собой одноклеточный эукариотический организм. Это, в сочетании с хорошо изученной генетической системой, делает их идеальным организмом для исследования основ клеточной биологии эукариот. Клетки разных видов дрожжей значительно крупнее бактериальных и морфологически весьма разнообразны. Они бывают круглые, овальные, цилиндрические, яйцевидные, колбовидные, треугольные, стреловидные и серповидные (рисунок 15).

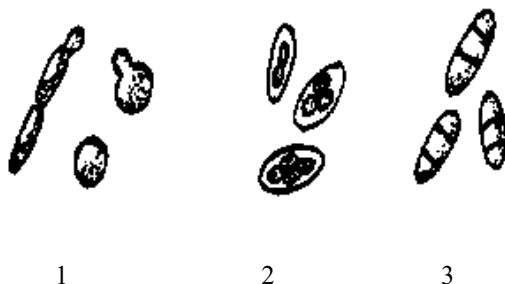


Рисунок 15. Морфология и размножение дрожжей: 1 – шаровидные и палочковидные почкующиеся клетки; 2 – эллипсоидные клетки со спорами; 3 – вытянутые делящиеся клетки

Это одноклеточные, неподвижные организмы. Дрожжевая клетка содержит дискретное ядро, окруженное ядерной мембраной, деление ядра протекает по механизму митоза, при котором хромосомы делятся и расходятся в метафазе. Кроме того, жизненный цикл дрожжей включает плазмогамию и мейоз, а также чередование гаплоидной и диплоидной фаз развития. Все это – характерные черты любого эукариотического организма. Наиболее распространенным способом вегетативного размножения дрожжей является почкование. При этом, дочерняя клетка возникает в виде маленькой почки, которая растет в течение большей части клеточного цикла, пока не достигнет размера материнской клетки. Рост дрожжей происходит в основном во время формирования почек, поэтому почка к моменту ее отделения становится по размеру более или менее такой же, как зрелая клетка. Клетки могут разойтись вскоре после деления, однако часто еще до их расхождения начинаются новые циклы клеточного деления, в результате которых клетки

иногда не отделяются друг от друга и образуют псевдомицелий, что характерно для дрожжей *Candida*.

Размножение делением встречается реже. Оно свойственно видам *Schizosaccharomyces*, клетки которых после деления могут не расходиться, в результате чего формируется истинный мицелий. Половое размножение большинства дрожжей (аскомицетов) связано с образованием репродуктивных структур – асков и аскоспор, которые формируются при ухудшении условий среды культивирования. Обычно половой процесс чередуется с вегетативным размножением.

Дрожжи имеют типичную для эукариотной клетки структурную организацию. Клеточная стенка дрожжей, в отличие от бактерий, легко различима в световом микроскопе. Клетки некоторых дрожжей могут иметь полисахаридную капсулу. В цитоплазме имеется ядро, митохондрии; как и у всех эукариотных организмов хорошо развит мембранный аппарат, представленный эндоплазматической сетью, аппаратом Гольджи и лизосомами. Клетки дрожжей при определенных условиях культивирования содержат гликоген, волютин, липиды.

Приготовление препаратов

Гликоген. Для его обнаружения используют клетки дрожжей, выросшие на пивном сусле и затем помещенные в раствор 20 %-ной сахарозы. В этих условиях клетки за сутки образуют большое количество гликогена. Клеточную суспензию в виде небольшой капли наносят на предметное стекло и добавляют к ней каплю раствора Люголя. Препарат накрывают покровным стеклом и через 2–3 мин микроскопируют под иммерсией. Наличие в цитоплазме бурых зернышек или крапинок указывает на присутствие гликогена. Поскольку реакция на гликоген хорошо идет в кислой среде, то перед выявлением в клетках гликогена среду, в которой выдерживали микроорганизмы, подкисляют. При подогревании препарата до 60°C бурая окраска гликогена исчезает, а после охлаждения восстанавливается.

Гранулеза. Наряду с гликогеном в клетках может накапливаться в качестве запасного вещества полисахарид гранулеза,

которая в результате взаимодействия с йодом окрашивается в тёмно-синий цвет. Для выявления гранулезы используют дрожжи, предварительно выдержанные на среде с картофелем. Клеточную суспензию вносят петлей в каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом, выдерживают 2–3 мин и микрофотографируют под иммерсией.

Волютин. Для выявления волютина используют дрожжи, выросшие на средах, богатых фосфатами. Из микробной культуры готовят мазок, высушивают на воздухе и фиксируют в пламени горелки. На фиксированный мазок наливают пипеткой метиленовый синий по Леффлеру и красят 3 мин. Затем препарат промывают водой, накрывают покровным стеклом и микрофотографируют. При этом клетки окрашиваются в голубой цвет, а волютин имеет вид капель сине-фиолетового цвета. Если на стык покровного и предметного стекла нанести каплю 1 %-ной серной кислоты, то в результате ее действия происходит обесцвечивание цитоплазмы клетки, за исключением волютина.

Жир. Для выявления жира используют дрожжи, выдержанные на среде с 2 %-ной глюкозой. Готовят препарат мазок, высушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки, окрашивают 3 мин суданом III, микрофотографируют под иммерсией. Включения жира окрашиваются в оранжевый цвет.

Сера. Включения серы встречаются только у прокариот. Благодаря двойному лучепреломлению капли серы хорошо заметны в клетках без специального окрашивания и исчезают при обработке клеток спиртом или при действии ледяной уксусной кислоты.

Измерение микроскопических объектов

Микроорганизмы измеряют окулярным микрометром, для определения истинного значения делений которого пользуются объективным микрометром. Единицей измерения является микрометр ($1\text{ мкм} = 1 \cdot 10^{-6}\text{ м}$). Окулярный микрометр – это круглая пластинка с нанесенной шкалой, разделенной на десятые доли миллиметра. Обычная длина шкалы 5 мм. Объективный микрометр – это предметное стекло со шкалой в 0,5 или 1 мкм, разделенной на сотые доли, т.е. цена одного деления равна 10 мкм.

Техника измерения состоит в следующем. Отвинчивают верхнюю линзу окуляра. Окулярный микрометр помещают делениями вниз на диафрагму окуляра и закручивают верхнюю линзу до получения ясного изображения шкалы. Поместив объективный микрометр на предметный столик микроскопа, совмещают первые черты шкал обоих микрометров, затем отсчитывают, во сколько делений объективного микрометра укладывается шкала окулярного микрометра. Например, шкала окулярного микрометра в 50 делений соответствует 10 делениям объективного микрометра (одно деление объективного микрометра равно 10 мкм, а 10 делений 100 мкм). Отсюда одно деление окулярного микрометра равно $100:50=2$ мкм. Определив величину деления окулярного микрометра, объективный микрометр заменяют препаратом и производят измерение исследуемого объекта. Если измеряемая клетка занимает в длину 2,5 и в диаметре 0,75 деления окулярного микрометра, значит, длина ее $2,5 \times 2 = 5$ мкм, а ширина $0,75 \times 2 = 1,5$ мкм. В табл. 2 приведены значения величин цены деления окулярного микрометра для некоторых комбинаций окуляров и объективов, что исключает необходимость применять объективный микрометр и ускоряет работу по определению размеров микроорганизмов.

Таблица 2

Значения величин окулярного микрометра для некоторых комбинаций окуляров и объективов

Окуляр	Объектив	Общее увеличение	Цена деления окулярного микрометра, мкм
10	40	400	3,4
10	90	900	1,5
15	40	600	3,0
15	90	1350	1,3

Объекты исследования Чистые культуры разных видов дрожжей. Дрожжи, выросшие на среде с сахарозой, глюкозой, фосфатами и картофелем.

Задания

1. Приготовить препараты «раздавленная капля» из предложенных культур дрожжей. Зарисовать их морфологию, найти почкующиеся и делящиеся клетки. Определить размеры дрожжевых клеток;
2. Приготовить препараты для выявления запасных питательных веществ: гликогена, гранулезы, волютина, жира и результаты наблюдений зарисовать;
3. Оформить отчет по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Морфология и размножение дрожжей;
2. Запасные вещества, условия их образования и значение.

Занятие 7. Определение антибиотикочувствительности микроорганизмов

Антибиотики – вещества природного или полусинтетического происхождения, подавляющие рост живых клеток, чаще всего прокариотических или простейших. Из-за огромного разнообразия антибиотиков и их воздействий на клетку и организм человека, существует множество классификаций антибиотиков: по мишени в клетке, по действию на микроорганизм (бактерицидные и бактериостатические) и др. Наиболее часто используемой является классификация по химической структуре.

Бета-лактамы антибиотики

Это антибиотики, которые объединяет наличие в структуре бета-лактамного кольца. Этот класс состоит из нескольких групп антибиотиков, основными из которых являются: пенициллины и цефалоспорины.

Мишенью действия бета-лактамовых антибиотиков в микробной клетке являются транспептидазы и карбоксипептидазы – ферменты, участвующие в синтезе пептидогликана – основного компонента клеточной стенки бактерий (образуют поперечные сшивки между мономерами). Благодаря способности связываться с пенициллинами и другими бета-лактамами эти ферменты получили второе название – пенициллинсвязывающие белки. Связывание бета-лактамовых антибиотиков с мишенью ведет к инактивации фермента, нарушению синтеза клеточной стенки, происходит выделение тейхоевых кислот в среду, в результате чего активируются ферменты, гидролизующие пептидогликан. В итоге это приводит к тому, что клеточная мембрана остается без механической опоры и наступает лизис клетки.

У грамположительных бактерий бета-лактамы поступают в клетку путем диффузии через капсулу и пептидогликан. Эти антибиотики не могут диффундировать через липополисахаридный слой в наружной мембране грамотрицательных бактерий и проникают в такие клетки через пориновые каналы внешней мембраны.

Устойчивость к бета-лактамовым антибиотикам определяется наличием ферментов бета-лактамаз, гидролизующих антибиотик. В результате межвидового генного переноса бета-лактамазы широко распространились у различных микроорганизмов, в том числе патогенных.

Макролиды

Группа антибиотических препаратов преимущественно бактериостатического действия. Основным структурным компонентом макролидов является 12–16-членное лактонное кольцо, к которому присоединены один или несколько углеводных остатков. Большинство макролидных антибиотиков является метаболитами *Streptomyces spp.* Первым клинически использованным макролидом был эритромицин.

Мишенью макролидов является узкий выходной тоннель большой субъединицы рибосомы, через который должен пройти синтезированный полипептид. Связывание макролидов с внутренней стенкой этого тоннеля закупоривает просвет, что приводит к остановке синтеза белков.

Тетрациклины

В основе молекул тетрациклинов лежит полифункциональное гидронафтаценовое соединение с родовым названием тетрациклин. Антибиотики этой группы ингибируют биосинтез белков. Причиной ингибирования синтеза белков является связывание тетрациклина с рибосомой, которое ослабляет взаимодействие рибосомы с тРНК.

Аминогликозиды

В группу аминогликозидных антибиотиков включают биологически активные соединения, содержащие в молекулах два или более аминсахара, которые связаны гликозидными связями с аминоклинтонным кольцом. К этим антибиотикам относятся стрептомицины, канамицин, гентамицин, амикацин и др. Известно более 100 антибиотиков, относящихся к этой группе соединений. Аминогликозиды имеют большое практическое значение. Несмотря на выделение многих новых антибиотиков, аминогликозиды широко применяются в медицинской практике для лечения тяжелых инфекционных заболеваний, и в первую очередь различных форм туберкулеза. Установлено, что аминогликозиды образуются не только определенными видами стрептомицетов, но и отдельными представителями родов *Micromonospora*, *Pseudomonas* и *Bacillus* и др. Основной мишенью действия аминогликозидов является бактериальная рибосома и связанный с нею синтез белка. Аминогликозиды ингибируют синтез белка на конечных этапах этого процесса – они тормозят образование белковой молекулы на стадии переноса аминоацил-тРНК к рибосомам, не затрагивая начальную стадию, т.е. стадию активации аминокислот.

Хинолоны

Эти антибиотики не имеют природного аналога.

По механизму действия принципиально отличаются от других АМП, что обеспечивает их активность в отношении устойчивых, в том числе полирезистентных, штаммов микроорганизмов. Класс хинолонов включает две основные группы препаратов, принципиально различающихся по структуре, активности, фармакокинетике и широте показаний к применению: не-

фторированные хинолоны (налидиксовая и оксолиновая кислота) и фторхинолоны (норфлоксацин, офлоксацин, левофлоксацин и др). В настоящее время разработано 4 поколения фторхинолонов. Ингибируя два жизненно важных фермента микробной клетки – ДНК-гиразу и топоизомеразу-4, фторхинолоны нарушают синтез ДНК, что приводит к гибели бактерий.

Механизмы антибиотикорезистентности

Антибиотики многообразны по своему строению, но все они обладают некоторой общностью действия на микроорганизмы. Во-первых, все антибиотики в той или иной степени сначала адсорбируются на клеточной стенке, во-вторых, антибиотики имеют мишень в клетке, на которую они воздействуют. В соответствии с этими этапами у микроорганизмов существуют механизмы противодействия антибиотикам.

Задержание на поверхности

Суть подобных механизмов заключается в том, что антибиотик задерживается на поверхности клетки и не проникает внутрь из-за ухудшения проницаемости или по другим причинам. Это свойство может быть обусловлено снижением связывания антибиотика с поверхностью клетки. Иногда образуются колонии, защищенные внеклеточным покровом, который препятствует проникновению антибиотика непосредственно к клеткам. Скорость проникновения антибиотиков в клетку может быть снижена за счет уменьшения размеров пориновых каналов, через которые «в норме» антибактериальные препараты быстро проникают внутрь бактерий.

Разрушение или модификация антибиотика

Образование

микробной клеткой веществ, способных инактивировать антибиотики, свойственно ряду микроорганизмов. Пенициллины, цефалоспорины, аминогликозиды и другие антибиотики легко разрушаются ферментами, продуцируемыми многими видами бактерий. Так, различные штаммы стафилококков, бакте-

рии рода *Bacillus* и многие виды грамотрицательных бактерий образуют ферменты беталактамазы, амидазы, инактивирующие молекулы пенициллинов, цефалоспоринов и других беталактамовых антибиотиков. Показано, что в клетках бактерий образование беталактамаз кодируется как хромосомными генами, так и генами плазмид. Таким образом, устойчивость многих видов бактерий к пенициллину связана с образованием ими ферментов (беталактамазы, или пенициллинамидазы), разрушающих молекулу антибиотика. Эти факторы резистентности определяют около 80 % случаев устойчивости бактерий. В целях предотвращения возникновения резистентных форм бактерий к беталактамовым антибиотикам, совместно с антибиотиками применяют ингибиторы беталактамаз (клавулановую кислоту, сульбактамы, тазобактам). Резистентность бактерий к эритромицину и другим макролидам связана с образованием ферментов типа фосфотрансфераз. Резистентность к тетрациклинам достигается благодаря ФАД-зависимой монооксигеназе, модифицирующей молекулу антибиотика. У гидроксильированной формы препарата снижается сродство к рибосоме. Кроме того, гидроксильированный тетрациклин подвергается не ферментативному разложению. Так как для гидроксильирования необходим кислород, такой вид резистентности работает только у бактерий, растущих в аэробных условиях.

Активный выброс антибиотика

Этот механизм осуществляется посредством специализированных насосов – помп множественного лекарственного выброса (Efflux pumps), имеющих белковую природу, которые обнаружены у многих видов бактерий. В зависимости от групп, к которым принадлежат микроорганизмы, выбрасывающие насосы могут быть однокомпонентными транспортерами или многокомпонентными системами, имеющими не только внутренний мембранный транспортер, а ещё внешний канал мембраны и периплазматический белок-адаптер. Выброс происходит во внеш-

нюю среду, а не в периплазму, что более выгодно для клетки, так как только что экспортированные антибиотики снова должны будут преодолеть внешнюю мембрану. Резистентные микроорганизмы благодаря системе энергозависимого выброса эффективно снижают концентрацию антибиотика внутри клетки и таким образом защищают себя от негативного действия препаратов.

Модификация мишени действия антибиотика

Изменение ответственного за чувствительность микробной клетки к антибиотику звена (мишени) – один из существенных факторов, определяющих появление резистентных форм. Устойчивость грамположительных бактерий (стафилококков, энтерококков) к бета-лактамам иногда связана с тем, что у этих бактерий происходит изменение конформации мишеней. Например, проявление резистентности у *Staphylococcus aureus* связано с возникновением нового пенициллинсвязывающего белка.

Устойчивость к хинолонам возникает в результате изменений двух основных целевых ферментов: ДНК-гиразы и топоизомеразы IV.

Перенос генов антибиотикорезистентности

Перенос генов может происходить в результате конъюгации, трансдукции или посредством транслоцирующихся элементов, а также за счет мутаций в хромосомных и плазмидных генах. Было установлено, что устойчивость штаммов бактерий к лекарственным препаратам определяется наличием плазмид, передаваемых при конъюгации. Фактор устойчивости (R-фактор) – это комплекс генов; часть из них ответственна за устойчивость к одному антибиотику, например, гентамицину, другие определяют устойчивость к другому антибиотику (стрептомицину), третьи облегчают «заражение» фактором устойчивости одной микробной клетки от другой. В первые годы применения антибиотиков «инфекционная» устойчивость к

ним встречалась редко. Но уже к 1965 г. до 60–70 % всех широко распространенных бактерий кишечной группы были носителями R-факторов и проявляли устойчивость к трем или большему числу антибиотиков. Более того, R-факторам свойственно сообщать бактериям устойчивость одновременно к нескольким химически различающимся препаратам. Плазмиды, несущие гены устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, обнаруживаются практически у всех групп патогенных бактерий. Поэтому частота резистентности к антибиотикам обусловлена, в первую очередь, распространением генов, детерминирующих устойчивость. Перенос генов устойчивости может происходить не только внутри клеток одного вида, но и у различных видов и родов микроорганизмов.

В результате широкого применения химиотерапевтических средств повсеместно распространяются R-факторы, так как они обладают мощными селекционными преимуществами, связанными со способностью придавать бактериям устойчивость одновременно ко многим лекарственным препаратам. Поэтому с прекращением использования на практике того или иного лекарственного препарата снижается и возможность появления устойчивых к нему форм бактерий. Устойчивость бактерий к антибиотикам, обусловленная R-факторами, существует даже у микроорганизмов, полученных из природных мест обитания (загрязненных водоемов, почвы).

Наряду с плазмидами, ответственными за устойчивость бактерий к антибиотикам, в бактериальных клетках имеются так называемые мигрирующие элементы, одни из которых – транспозоны – сложные структуры, иногда содержащие дополнительные гены, связанные с резистентностью к антибиотикам. Но и сами продуценты многих антибиотиков способны служить источниками генов резистентности, передавая их с помощью различных механизмов другим микроорганизмам, в том числе и патогенным. Это подтверждается результатами исследований последнего времени, в которых показано, что гены, участвующие в биосинтезе ряда антибиотиков (аминогликозидов, эрит-

ромицина, актиномицинов и некоторых других), подобны генам, которые кодируют устойчивость к этим антибиотикам. Иными словами, продуценты антибиотиков имеют гены резистентности к собственным антибиотикам, одновременно проявляя устойчивость к другим.

Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам

Современные стандартизованные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП) подразделяют на методы серийных разведений и диффузионные.

Методы серийных разведений основаны на прямом определении основного количественного показателя, характеризующего активность АБП – величины его минимальной подавляющей концентрации (МПК).

МПК – минимальная концентрация, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма в бульонной культуре.

Для определения МПК заданные концентрации АБП вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого микроорганизма и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста.

Диффузионные методы определения чувствительности основаны на диффузии АБП из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация АБП превосходит МПК.

В диско-диффузионном методе в качестве носителя АБП используют бумажный диск. Образование зоны подавления роста происходит в результате диффузии АБП из носителя в питательную среду. В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК. Оба метода позволяют отнести исследуемый микроорганизм к одной из категорий чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный).

Основные этапы проведения тестирования:

1. приготовление питательных сред;

2. приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулята);
3. посев микроорганизмов на питательную среду (инокуляция);
4. инкубация в благоприятных для роста микроорганизма условиях;
5. учет и интерпретация результатов.

Для оценки чувствительности используют богатую питательную среду (среда Мюллера-Хинтона, среда LB). В методе двукратных серийных разведений используют жидкую питательную среду, тогда как для диско-диффузионного метода необходима агаризованная среда.

Все этапы работы с культурой и средой осуществляются стерильно, с использованием стерильной посуды в ламинарном шкафу.

Приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулята)

Культуру микроорганизмов, выращенную на жидкой питательной среде в течение ночи, доводят до нужной плотности.

Для этого:

- 1) измеряют оптическую плотность (ОП) ночной культуры на спектрофотометре или фотоэлектрокалориметре при длине волны 600 нм;
- 2) разводят культуру физиологическим раствором до $ОП=0,1$ в объеме 5 мл в пробирке;
- 3) разводят культуру питательной средой еще в 100 раз, внося в стерильную чашку Петри 200 мкл культуры и 20 мл питательной среды. Осторожно перемешивают.

Инокулят готов к использованию.

Метод двукратных серийных разведений в бульоне.

1. В лунки стерильного 96-луночного, плоскодонного полистиролового планшета многоканальным дозатором разливают по 100 мкл питательной среды.

2. В первые лунки рядов вносят 100 мкл рабочего раствора исследуемых антибиотиков (концентрация 0,4 г/л).

3. Многоканальным дозатором перемещают из лунок 1-го ряда в лунки 2-го по 100 мкл, затем из лунок 2-го в лунки 3-го и т.д. Эту процедуру повторяют, пока не будет приготовлен весь необходимый ряд разведений. Из последнего ряда лунок 100 мкл бульона удаляют.

Таким образом, получают ряд лунок с растворами АБП, концентрации которых отличаются в соседних лунках в 2 раза.

4. В лунки с антибиотиком вносят по 100 мкл инокулята.

5. Верхний ряд планшета заполняют 200 мкл питательной среды, не внося инокулят (контроль стерильности). В лунки нижнего ряда вносят 100 мкл среды и 100 мкл инокулята, не добавляя АБП (положительный контроль).

6. Закрытые планшеты инкубируют в термостате при 35°C в течение 20–24 ч.

7. Учет результатов проводят визуально или спектрофотометрически, сравнивая рост микроорганизма в присутствии АБП с ростом культуры в лунке без АБП. За МПК принимают минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемого микроорганизма.

Проводя расчет концентраций антибиотиков в лунках планшета следует учитывать, что концентрация в первой лунке после приготовления разведений и внесения культуры уменьшается в 4 раза, по сравнению с исходной.

Диско-диффузионный метод (ДДМ)

Принцип ДДМ определения чувствительности основан на способности АБП диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара.

1. Растопленную агаризованную питательную среду разливают по 20 мл в чашки Петри (диаметр 90 мм). После заполнения чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Перед инокуляцией необходимо проконтролировать отсутствие конденсата жидкости на внутренней поверхности крышек.

2. Инокулят наносят пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1–2 мл, равномерно распределяют по поверхности покачиванием, после чего удаляют избыток инокулята пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 10–15 мин.

3. На поверхность питательной среды наносят диски с АБП. Аппликацию дисков проводят с помощью стерильного пинцета. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15–20 мм. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

4. Чашки Петри помещают в термостат кверху дном и инкубируют при температуре 35°C в течение 18–24 ч.

5. Для учета результатов после окончания инкубации чашки помещают кверху дном на темную матовую поверхность. Диаметр зон задержки роста измеряют с точностью до 1 мм линейкой или штангенциркулем (рисунок 16).



Рисунок 16. Измерение диаметра зон задержки роста колоний
(пояснения в тексте)

Интерпретация результатов

Интерпретация результатов оценки антибиотикочувствительности заключается в отнесении исследуемого микроорганизма к одной из трех категорий.

- Чувствительный – рост микроорганизма подавляется при концентрациях АБП, создающихся в органах и тканях человека при рекомендуемых режимах дозирования.

- Промежуточный – МПК АБП в отношении штаммов микроорганизмов этой категории выше, чем в отношении чувствительных, но находится в пределах, достижимых при рекомендуемых режимах дозирования.

- Устойчивый – рост не подавляется при концентрациях АБП, создающихся в органах и тканях при рекомендуемых режимах дозирования. Для устойчивых штаммов характерно наличие определенных механизмов резистентности. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, скорее всего, будет неэффективным.

Интерпретация осуществляется на основании сопоставления результатов исследования (величины МПК АБП или диаметра зоны подавления роста) с пограничными значениями этих параметров, отделяющих чувствительные штаммы от промежуточных и промежуточные от устойчивых (табл. 3).

Объекты исследования:

Штаммы *Escherichia coli* K12 и *Escherichia coli* K12 pBR 322

Задания

1. Провести оценку антибиотикочувствительности исследуемых штаммов методом двукратных серийных разведений

2. Провести оценку антибиотикочувствительности исследуемых штаммов диско-диффузионным методом

3. Осуществить интерпретацию результатов и сравнить исследуемые штаммы по антибиотикочувствительности.

4. Оформить отчет о лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные группы антибактериальных препаратов.
2. Каковы основные мишени действия антибиотиков в бактериальной клетке?
3. Охарактеризуйте основные механизмы антибиотикорезистентности.
4. На чем основано определение антибиотикочувствительности методом серийных разведений?
5. Что лежит в основе диффузионного метода определения антибиотикочувствительности?
6. О чем свидетельствует принадлежность штамма к группе устойчивых?

Таблица 3

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности бактерий семейства *Enterobacteriaceae*: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП

Антибактериальные препараты	Содержание в диске (мкг)	Ø зон подавления роста (мм)			МПК (мг/л)		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
1	2	3	4	5	6	7	8
БЕТА-ЛАКТАМЫ							
Ампициллин	10	≤ 13	14–16	≥ 17	≥ 32	16	≤ 8
Ампициллин/ Сульбактам	10/10	≤ 11	12–14	≥ 15	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Амоксициллин/ Клавуланат	20/10	≤ 13	14–17	≥ 18	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Тикарциллин/ Клавуланат	75/10	≤ 14	15–19	≥ 20	≥ 128/2	32/2–64/2	≤ 16/2
Цефалотин	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефазолин	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефаклор	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефамандол	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефуросим Na	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефуросим аксетил	30	≤ 14	15–22	≥ 23	≥ 32	8–16	≤ 4
Цефокситин	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8

Окончание таблицы

Цефотетан	30	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 64	32	≤ 16
Цефметазол	30	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 64	32	≤ 16
Цефоперазон	75	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 64	32	≤ 16
Цефотаксим	30	≤ 14	15–22	≥ 23	≥ 64	16–32	≤ 8
Цефтриаксон	30	≤ 13	14–20	≥ 21	≥ 64	16–32	≤ 8
Цефтазидим	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефиксим	5	≤ 15	16–18	≥ 19	≥ 4	2	≤ 1
Цефподоксим	10	≤ 17	18–20	≥ 21	≥ 8	4	≤ 2
Цефтибутен	30	≤ 17	18–20	≥ 21	≥ 32	16	≤ 8
Цефепим	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Азтреонам	30	≤ 15	16–21	≥ 22	≥ 32	16	≤ 8
Имипенем	10	≤ 13	14–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4
Меропенем	10	≤ 13	14–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4
Эртапенем	10	≤ 15	16–18	≥ 19	≥ 8	4	≤ 2
<i>АМИНОГЛИКОЗИДЫ</i>							
Канамицин	30	≤ 13	14–17	≥ 18	≥ 64	32	≤ 16
Гентамицин	10	≤ 12	13–14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
Тобрамицин	10	≤ 12	13–14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
Нетилмицин	30	≤ 12	13–14	≥ 15	≥ 32	16	≤ 8
Амикацин	30	≤ 14	15–16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16
<i>ХИНОЛОНЫ</i>							
Налидиксовая кислота	30	≤ 13	14–18	≥ 19	≥ 32	–	≤ 16
Норфлоксацин	10	≤ 12	13–16	≥ 17	≥ 16	8	≤ 4
Пефлоксацин	5	≤ 15	16–21	≥ 22	≥ 8	4	≤ 1
Офлоксацин	5	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 8	4	≤ 2
Ципрофлоксацин	5	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1
Ломефлоксацин	10	≤ 18	19–21	≥ 22	≥ 8	4	≤ 2
Левофлоксацин	5	≤ 13	14–16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2
Гатифлоксацин	5	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 8	4	≤ 2
<i>ТЕТРАЦИКЛИНЫ</i>							
Тетрациклин	30	≤ 14	15–18	≥ 19	≥ 16	8	≤ 4
Доксициклин	30	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4
<i>ДРУГИЕ ПРЕПАРАТЫ</i>							
Хлорамфеникол	30	≤ 12	13–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8

Занятие 8. Определение способности бактерий к формированию биопленок

До конца XX в. было принято считать, что в естественных условиях микроорганизмы существуют в свободно-взвешенном состоянии, и все описанные свойства бактерий изучались на планктонных формах чистых культур. В настоящее время известно, что в естественной среде обитания до 99 % всех микроорганизмов существует в виде биопленок.

Микробные биопленки – это постоянно обновляющееся сообщество микробов, закрепившихся на биогенном или абиогенном субстрате и окруженных полимерным матриксом, который предохраняет их от вредных воздействий и является одним из факторов межклеточного взаимодействия.

Биопленки формируются на границе раздела твердой и жидкой или твердой и газообразной фаз. В структуре биопленок можно выделить три основных компонента: бактериальные клетки, внеклеточный матрикс и поверхностную оболочку.

Клетки биопленках могут принадлежать к одному виду или включать несколько групп неродственных микроорганизмов. Бактерии в составе биопленок различаются по многим признакам: это могут быть живые и погибшие клетки; живые микроорганизмы имеют различную специализацию, которая зависит от места их расположения; бактерии внутри биопленок различаются также по наличию капсул, размеру, подвижности и скорости роста. Для расселения в биопленках образуются специальные плавающие клетки, временно неспособные к размножению. Различаются клетки и по их отношению к действию различных неблагоприятных факторов. Выявлены группы клеток, получившие название «персистеры», находящиеся в состоянии, при котором они невосприимчивы ко всем известным антибиотикам. Такие клетки, как правило, находятся в стадии физиологического покоя («клеточного анабиоза»).

Вторым компонентом биопленок является внеклеточный матрикс, который продуцирует клетки микроорганизмов, образующих биопленку. Матрикс состоит из комплекса органических соединений и заполняет все пространство между клетками. В его составе найдены белки, липиды, внеклеточные ДНК и РНК, однако основным компонентом являются полисахариды. Матрикс выполняет ряд важных функций: повышает прочность биопленки, удерживает воду, защищает клетки от высыхания, обеспечивает перераспределение в биопленке потоков органических и неорганических молекул. Компоненты межклеточного матрикса способны связывать и нейтрализовать многие химические вещества, поступающие из окружающей среды и способные оказывать негативное действие на бактериальные клетки.

Еще одним важным компонентом биопленки является поверхностная оболочка. Она представляет собой часть матрикса, имеет ряд выраженных морфологических признаков и служит границей с внешней средой. Оболочка имеет слой липидов, организация которого напоминает элементарную плазматическую мембрану. По качественному составу липиды, обнаруженные в поверхностной оболочке матрикса и мембран бактерий достаточно сходны, однако отличаются по количеству отдельных компонентов. Поверхностная оболочка биопленок, окружает всё сообщество и препятствует свободному проникновению в него различных веществ из среды, а также защищает микроорганизмы от действия различных неблагоприятных внешних факторов.

Образование биопленок – это сложный комплексный процесс, в котором выделяют несколько основных стадий.

1. Первичная адгезия. На первой стадии биопленкообразования происходит первичное прикрепление микроорганизмов к поверхности (адгезия, сорбция) из окружающей среды (обычно жидкости). Изначальное прикрепление микробной клетки к поверхности субстрата осуществляется за счет действия электростатических, гидрофобных сил, сил Ван дер Ваальса, неспецифической адгезии. Данная стадия обратима.

2. Необратимая адгезия. Вторая стадия формирования биопленки представляет собой необратимое прикрепление клеток – фиксация. На этой стадии микробы выделяют внеклеточные полимеры, обеспечивающие прочное прикрепление клеток к субстрату.

3. Созревание. Первый слой клеток, прикрепившихся к поверхности, облегчает прикрепление последующих клеток, а внеклеточный матрикс удерживает вместе всю колонию. Происходит накопление питательных веществ, вследствие чего клетки начинают делиться. Зрелая биопленка способна изменять свой размер и форму. Защитой клеток от внешних угроз служит внеклеточный матрикс.

4. Дисперсия. Периодически в окружающую среду происходит выброс бактерий, которые способны через некоторое время прикрепиться к поверхности и образовать новую колонию.

Биопленки распространены повсеместно. Они обнаруживаются практически на любой твердой поверхности на границе раздела твердой и жидкой фаз. Эти структуры активно используются человеком в хозяйственной деятельности. Микроорганизмы в составе биопленок участвуют в очистке сточных вод, биodeградации трудно разлагаемых субстратов, биотехнологической продукции различных соединений и т.д.

Существование микроорганизмов в виде биопленок обеспечивает им преимущества по сравнению с изолированными клетками. В этих сообществах они приобретают повышенную способность к выживанию в присутствии агрессивных веществ и устойчивость к антибактериальным препаратам, легко могут обмениваться генами резистентности, становятся невосприимчивыми к антибиотикам, воздействию факторов иммунной системы хозяина, фагоцитозу и др. Установлено, что микроорганизмы в составе биопленок выживают в присутствии антибиотиков с концентрацией в 500–1000 раз больших, чем их минимальная подавляющая концентрация для планктонных форм. Образование биопленки идет достаточно быстро, эксперимен-

тально показано, что начальные элементы биопленки могут сформироваться в течение двух часов инкубации, достигая максимальной интенсивности уже через 24 часа.

Биопленки являются одной из значительных проблем в медицине. Они могут образовываться как на неповрежденных участках тела человека, так и в ранах. Обрастая имплантаты (искусственные клапаны сердца, протезы), глазные полимерные линзы и катетеры, попадают в кровяное русло, вызывают сепсис и могут привести к смерти. Лечение антибиотиками становится неэффективным из-за низкой чувствительности микроорганизмов в составе биопленок к антибактериальным препаратам и их быстрой приспособляемости к меняющимся условиям среды за счет высоких адаптивных возможностей. Для патогенных микроорганизмов способность формировать биопленки является одним из факторов патогенности. В связи с этим существует необходимость изучения процессов, происходящих в биопленках, а также поиска новых способов воздействия на развитие и регуляцию биопленкообразования.

Метод определения способности к биопленкообразованию

В ходе работы сравнивается способность различных микроорганизмов формировать биопленки.

Все манипуляции, связанные с приготовлением инокулята и посевом, проводятся в стерильных условиях (в ламинарном шкафу с использованием стерильных сред и посуды).

Культуры микроорганизмов, выращенные на жидкой питательной среде в течение ночи, доводят до нужной плотности.

Для этого:

1) измеряют оптическую плотность (ОП) ночной культуры на спектрофотометре или фотоэлектрокалориметре при длине волны 600 нм;

2) разводят культуру стерильной питательной средой до ОП=0,1 в объеме 5 мл в пробирке;

3) разводят культуру питательной средой еще в 10 раз, внося в стерильную чашку Петри 2 мл культуры и 20 мл питательной среды. Осторожно перемешивают. Инокулят готов к использованию;

4) в лунки одного ряда (8 лунок) стерильного 96-луночного, плоскодонного полистиролового планшета многоканальным дозатором вносят по 200 мкл инокулята. Аналогичным образом в лунки соседнего ряда вносят инокулят культуры другого микроорганизма;

5) закрытые планшеты инкубируют при 35°C в течение 20–24 ч;

6) если в дальнейшем будет проводиться расчет удельного биопленкообразования, то на этом этапе (после инкубации) необходимо провести измерение оптической плотности культуры в лунках планшета с помощью планшетного спектрофотометра при длине волны 625нм;

7) удаляют культуру из планшета резким встряхиванием;

8) с помощью многоканального дозатора дважды промывают планшет 200 мкл дистиллированной воды, после чего высушивают планшет;

9) вносят в каждую лунку, где выращивали биопленки, а также в ряд контрольных лунок 150 мкл. 0,1 % генцианвиолета и оставляют на 10 мин. После чего удаляют краситель;

10) пятикратно промывают планшет дистиллированной водой и высушивают его;

11) в окрашенные лунки вносят 200мкл. 96 % этанола и через 20 мин. измеряют оптическую плотность (ОП) при длине волны 570 нм;

12) проводят расчет среднего значения по данным в 6 лунках (данные из верхней и нижней лунок не учитывают);

13) если необходимо, то проводят расчет удельного биопленкообразования по формуле:

$$(\text{ОП}_{570 \text{ эксп.}} - \text{ОП}_{570 \text{ контр.}}) / \text{ОП}_{625}, \text{ где:}$$

ОП_{570 эксп} — оптическая плотность в экспериментальной лунке (с выращенной биопленкой) после экстракции красителя при длине волны 570 нм,

ОП_{570 контр} — то же в контрольной лунке (без биопленки),

ОП₆₂₅ — оптическая плотность культуры при длине волны 625 нм.

Объекты исследования

Культуры *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina flava* (на выбор преподавателя).

Задания

1. Изучить способность исследуемых микроорганизмов к биопленкообразованию.
2. Сравнить исследуемые микроорганизмы по способности к формированию биопленок.
3. Оформить отчет о лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте основные стадии развития биопленки.
2. Каковы основные черты и особенности биопленок?
3. Каково практическое значение биопленок?

Занятие 9. Получение чистых культур и количественный учет микрофлоры воздуха

Факторы, действующие на микроорганизмы, довольно разнообразны. Поэтому для выяснения значимости каждого фактора и его специфического воздействия все их можно разделить на две группы: средообразующие и экологические.

Экологические факторы, в отличие от средообразующих, довольно не постоянны во времени и,

следовательно, существенным образом могут ограничивать рост организмов.

Каждый экологический фактор характеризуется определенными количественными показателями и прежде всего амплитудой, которая выражается двумя точками – минимумом и максимумом. Таким образом, биологический процесс может осуществляться не при любых значениях фактора, а в пределах этих двух значений, которые представляют собой границы толерантности данного процесса относительно данного фактора. Эти границы определяются с одной стороны недостаточностью, а с другой – избыточностью данного фактора и являются зонами наибольшего угнетения. Наилучшее развитие микроорганизмов идет при оптимальной интенсивности фактора. В природных условиях все экологические факторы тесно взаимосвязаны друг с другом и изменение одного из них, как правило, ведет за собой изменение того или иного фактора; следует иметь в виду их взаимодействие. Для удобства все экологические факторы можно разделить на три группы:

1. *абиотические* – физические (магнитное поле, свет, ионизирующее излучение, температура) и химические (химический состав среды)

2. *биотические* – фитогенные (растения), зоогенные (животные) и микрогенные (грибы, водоросли, бактерии)

3. *антропогенные* – различные формы деятельности человека, влияющие на окружающую среду.

Средообразующие факторы всегда более или менее постоянны во времени, в количественном выражении они всегда находятся в избытке и не лимитируют жизнедеятельность микроорганизмов. Выделяют три вида средообразующих факторов – почва, вода и воздух.

Воздух – это не однородная среда, а совокупность нескольких газов и примесей и – как отмечал еще В.И. Вернадский – продукт жизнедеятельности организмов. Это, прежде всего, относится к основным газам атмосферы – кислороду

(21,0 %), азоту (78,06 %), углекислому газу (0,033 %). Кроме этих основных газов в воздухе содержатся такие как неон, криптон, ксенон, а также примеси – аммиак и сероводород.

Вопрос о наличии микроорганизмов в воздухе был впервые поставлен на научную основу Луи Пастером. В результате длительной дискуссии и проведенных им убедительных опытов, было установлено, что в воздухе в довольно больших количествах находятся жизнеспособные формы микроорганизмов.

Несмотря на то, что атмосфера является неблагоприятной средой обитания для микроорганизмов, они находятся в ней постоянно. В атмосфере действуют такие неблагоприятные факторы, как ультрафиолетовое облучение и высушивание, но существуют и благоприятные факторы – в воздухе постоянно присутствуют пылевые частицы, на которых адсорбируются водяные пары и различные соединения. Это может способствовать развитию микроорганизмов.

Все микроорганизмы, находящиеся во взвешенном состоянии и пассивно переносимые токами воздуха, объединяют понятием «аэропланктон». Эти микроорганизмы подчиняются целиком физическим законам, как и любая частица соответствующего размера.

Согласно соответствующим представлениям микроорганизмы могут находиться в воздухе в одной из трех фаз: капельной, капельно-ядерной и пылевой. В капельной фазе бактерии находятся внутри водно-солевой оболочки. По мере высыхания концентрация веществ, растворенных в капле, увеличивается, а на поверхности бактериальной клетки откладываются соли. Такие структуры представляют собой фазу капельных ядер. Связанные с пылевыми частицами клетки микроорганизмов представляют собой пылевую фазу. В этой фазе бактерии наиболее устойчивы к воздействию факторов окружающей среды.

Условия для существования микроорганизмов в воздухе во взвешенном состоянии являются для них благоприятными. Это объясняется тем, что с одной стороны, в воздушной среде

питательные вещества находятся в ограниченном количестве, а с другой – сами бактерии находятся главным образом в виде сухих частиц и реже – капель. В таком состоянии они подвергаются сильному воздействию обезвоживания, резкому перепаду температур, действию ультрафиолетового излучения. Это существенным образом ограничивает рост и размножение микроорганизмов. Однако нельзя полностью исключать такую возможность их существования в воздухе в виде популяций.

При сочетании высокой влажности воздуха, благоприятной температуры, отсутствия солнечных лучей, наличия питательных веществ могут создаваться условия для размножения отдельных видов бактерий. Такие условия могут быть в низко расположенных облаках. При проведении исследований было обнаружено более высокое содержание бактерий именно в облаках по сравнению с другими слоями воздуха. Колебания количественного и качественного составов микрофлоры воздуха наблюдаются при смене времен года и зависят от климатических зон. Наиболее высокие концентрации жизнеспособных бактерий выявляются в теплый период года, а наиболее низкие – в зимний. Последнее в первую очередь связано с наличием снежного покрова, который препятствует поступлению почвенной микрофлоры в воздух. Большое влияние на численность микроорганизмов оказывает выпадение осадков в виде дождя и снега, которые удаляют основную массу взвешенных микроорганизмов из воздуха. Другим важным источником поступления микроорганизмов в воздух является поверхность морей и океанов. Если с поверхности суши микроорганизмы поступают в воздух главным образом в виде пылевой фазы, то морская микрофлора в виде капельной.

Жизнедеятельность человека и его активная преобразующая роль оказывают существенное влияние на характер и численность микрофлоры воздуха. Урбанизация – создание крупных промышленных предприятий – приводит к существенному увеличению в составе воздуха различных веществ: сероводоро-

да, аммиака, окислов азота и серы, органических веществ, что способствует созданию благоприятных условий для развития микрофлоры воздуха. С другой стороны, трудовая деятельность человека – (микробиологическая промышленность) увеличивает разнообразие микрофлоры воздуха. Таким образом, под влиянием ряда факторов складывается микрофлора воздуха, характер которой может существенно различаться в разных районах, благодаря малым размерам микроорганизмов они способны с токами воздуха перемещаться на большие расстояния и в результате этого идет усреднение качественного и количественного составов микроорганизмов в воздухе.

Для определения общего количества микроорганизмов в различных субстратах применяют ряд методов: прямой подсчет клеток под микроскопом (в счетных камерах, на фиксированных окрашенных мазках, на мембранных фильтрах), выделение и учет высевом на плотные (чашечный метод Коха) и в жидкие (метод предельных разведений) питательные среды. Методы прямого подсчета клеток под микроскопом дают возможность наиболее полно учесть численность микроорганизмов в субстрате. Однако при этом учитываются и живые, и мертвые клетки, поэтому результаты подсчета могут быть не вполне точными. Методами посева на плотные питательные среды учитываются только жизнеспособные клетки микроорганизмов. Для выделения и учета как можно более широкого круга микроорганизмов, населявших данный субстрат, используют метод Коха. Данный метод позволяет не только учесть численность микроорганизмов, но и оценить их разнообразие по морфологии колоний.

Чашечный метод учета микроорганизмов (метод Коха) заключается в высеве определенного объема исследуемой суспензии или осаждении микроорганизмов за определенный промежуток времени на плотную питательную среду в чашки Петри и последующем подсчете выросших колоний. Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее из од-

ной клетки. Установлено, что на площади 100 см^2 в течение 5 мин оседает столько микробных клеток, сколько их содержится в 10 л воздуха. Зная площадь чашки Петри, можно определить количество микроорганизмов в 1 м^3 воздуха.

Пример подсчета. В чашке Петри в результате 5 мин выдержки на воздухе выросло 25 колоний.

1. Поскольку радиус чашки Петри обычно составляет 5 см, определяют площадь питательной среды по формуле πr^2 , которая равна $3,14 \times 25 = 78,5 \text{ см}^2$.

2. Вычисляют количество колоний на площади $1 \text{ дм}^2 = 100 \text{ см}^2$:

25 колоний – $78,5 \text{ см}^2$

x колоний – 100 см^2

$$x = 25 \times 100 / 78,5 = 32 \text{ колонии}$$

Перечисляют количество бактерий на 1 м^3 воздуха (1000 л), составляя пропорцию:

32 колонии – 10 л

x колоний – 1000 л

$$x = 32 \times 1000 / 10 = 3200 \text{ колоний}$$

Следовательно, в 1 м^3 воздуха содержится 3200 бактерий.

Описание колоний. Для описания колоний используются культуральные свойства микроорганизмов, к которым относятся, прежде всего характерные особенности роста на плотных питательных средах. В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне чашки), различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются большим разнообразием и является наиболее существенной особенностью роста микроорганизмов на плотном субстрате. При их описании учитываются следующие признаки:

Форма колонии – округлая, амёбовидная, ризоидная;

размер колонии – диаметр, колонии в мм;

поверхность колонии – гладкая, шероховатая, складчатая;
 блеск колоний – блестящая, матовая, тусклая, прозрачная;
 цвет колонии – белая, желтая, красная, серая, фиолетовая;

Глубинные колонии, напротив, довольно однообразны. Чаще всего они по виду похожи на более или менее сплюснутые чечевички, имеющие форму овалов с заостренными концами. Данные колонии имеют вид тонких прозрачных пленок, стелющихся по дну (рисунок 17, 18).

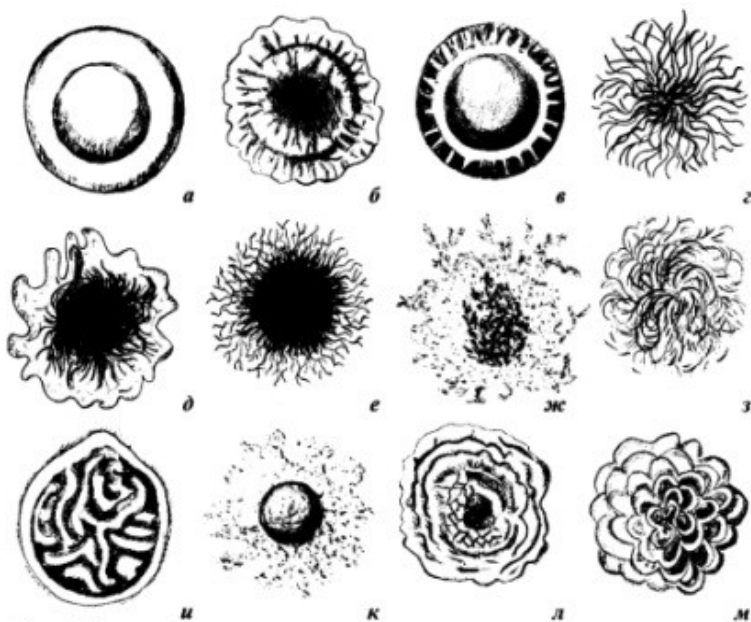


Рисунок 17. Внешний вид (форма) колоний:

а – круглая; б – круглая с фестончатым краем; в – круглая с валиком по краям; г, д – ризоидные; е – круглая с ризоидным краем; ж – амёбовидная; з – нитевидная; и – складчатая; к – неправильная; л – concentрическая; м – сложная

Описание колоний часто дополняют описанием роста микробной популяции по штриху на поверхности скошенной плотной среды. Отмечают интенсивность роста по штриху:

скудный, умеренный, обильный и его особенности: налет сплошной с ровными или волнистыми краями, четковидный в виде цепочки изолированных колоний, диффузный, перистый, древовидный (рисунок 19)



Рисунок 18. Профиль колоний:

а – изогнутый; б – кратерообразный; в – бугристый; г – врастающий в агар; д – плоский; е – выпуклый; ж – каплевидный; з – конусовидный

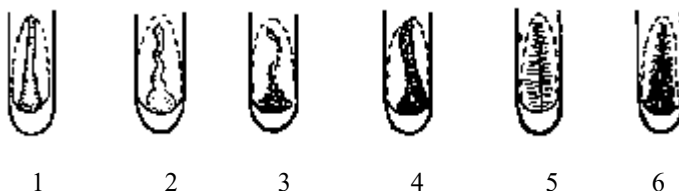


Рисунок 19. Рост бактерий по штриху:

1 – сплошной с ровным краем; 2 – сплошной с волнистым краем; 3 – четковидный; 4 – диффузный; 5 – перистый; 6 – ризоидный

Характеризуют оптические свойства штриха, его цвет, поверхность и консистенцию. При описании колоний следует учитывать состав среды и возраст культуры, так как колонии одного и того же организма на различных средах и разные по возрасту могут отличаться рядом признаков.

Объекты исследования: чистые культуры микроорганизмов, выросшие на чашках и на скошенном агаре в пробирках.

Задания

1. Провести количественный учет микрофлоры воздуха;
2. Дать описание колоний выделенных микроорганизмов;
3. Определить морфологию бактерий, используя препарат «мазок»;
4. Дать описание роста выделенных микроорганизмов по штриху;
5. Оформить отчет по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

- 1) Что называют «аэропланктон»?
- 2) Назовите основные лимитирующие факторы жизни микроорганизмов в воздухе.
- 3) В какие сезоны года численность микроорганизмов в воздухе максимальна и почему?

Занятие 10. Микрофлора воды и почвы

Почва представляет собой наиболее благоприятную естественную среду обитания. Она содержит достаточное количество органических и минеральных веществ, защищает микроорганизмы от действия радиации и высыхания.

Наиболее обильно микроорганизмами заселен верхний слой почвы (10 см), в котором преимущественно развиваются бактерии, составляющие до 90 % всей микрофлоры. Численность микроорганизмов в почве зависит от типа почвы и климатической зоны. Однако почва является не только средой обитания, но и объектом воздействия микроорганизмов.

Вода как и почва является благоприятной средой обитания для многих микроорганизмов. Их численность зависит от степени загрязнения водоема. Наибольшая численность

микроорганизмов наблюдается в закрытых водоемах, расположенных вблизи городов. Микроорганизмы, развиваясь в водной среде, оказывают и существенное влияние на ее состав. Им принадлежит важная роль в очистке и продуктивности водоемов. Особенностью многих водоемов является их обогащение органическими веществами, поступающими со сточными водами. Микроорганизмы принимают активное участие в их разложении, а накопленная микробная биомасса является кормом для более высших организмов. Таким образом, роль микроорганизмов в продуктивности водоемов сводится к передаче энергии химических соединений в виде биомассы более высшим организмам. Наряду с положительной ролью микроорганизмы оказывают и вредное воздействие. Некоторые из них в процессе жизнедеятельности могут выделять в окружающую среду токсичные продукты, другие же могут быть патогенными.

Наиболее удобными для экологических исследований являются водные экосистемы, хорошо отграниченные и легко поддающиеся описанию, к таким относятся пруды и озера. В них имеются как аэробные, так и анаэробные зоны, которые можно обнаружить и в большинстве почв. Но если в почве они тесно сосредоточены и довольно легко поддаются исследованию. Поэтому есть основания полагать, что результаты исследований прудов и озер в какой-то степени можно перенести и на почву с ее микрогетерогенностью.

Озера довольно легко поддаются классификации. В основу ее может быть положена степень трофности, т.е. наличие питательных веществ, необходимых для развития микроорганизмов.

Озера, богатые элементами питания с дефицитом кислорода и обильным развитием фитопланктона, принято называть *евтрофными*, а бедными – *олиготрофными*. Было обнаружено большое разнообразие переходных форм, которые получили название *мезотрофных*. Поэтому понятия

олиготрофия и *евтрофия* все более приобретают смысл не как основа классификации, а как понятия, характеризующие озеро в смысле богатства населением.

Профиль воды водоемов закрытого типа неоднороден и имеет несколько слоев или зон, отличающихся рядом экологических параметров, т.е. обладает стратификацией. По наличию стратификации выделяют три типа озер:

- 1) *голомиктические* (с полным перемешиванием слоев);
- 2) *меромиктические* (с частичным перемешиванием);
- 3) *амиктические* (со стабильной слоистостью),

К первому типу относятся пресноводные озера умеренных широт. В этих озерах весной холодная вода прогревается солнцем и верхний слой воды становится теплым, а его плотность уменьшается. Этот верхний теплый слой называется *эпилимнионом*, он лежит поверх более холодного слоя воды с большей плотностью – *гиполимнионом*. Эти слои разделены переходной зоной – *металимнионом* (*хемоклином* или *термоклин*ом). В глубоких озерах такое разделение – стратификация может сохраняться в течение всего лета. В результате процессов аэробного распада органических веществ растворенный в воде кислород, начиная с придонного слоя, расходуется и в гиполимнионе создаются анаэробные условия. Эпилимнион, соприкасаясь с кислородом воздуха, перемешивается ветром и поэтому остается аэробной зоной. Это создает градиент окислительно-восстановительного потенциала и химических градиентов в области *термоклина*, который называется также *хемоклином*, или *металимнионом*.

Осенью происходит охлаждение эпилимниона и более теплые слои воды гиполимниона поднимаются вверх. В результате этого происходит полное перемешивание всех слоев и нарушается стратификация. Вода по всей глубине равномерно обогащается кислородом и питательными веществами. В зимний период в таких озерах может устанавливаться обратная стратификация, которая вновь нарушается в весенний период.

После перемешивания в весенний период создается летняя стратификация.

Определение числа жизнеспособных бактерий в почве высевом на плотные питательные среды (чашечный метод Коха). Сущность его заключается в высеве определенного объема исследуемой суспензии микроорганизмов на плотную среду в чашки Петри и подсчете выросших после инкубации колоний. Принято считать, что каждая колония – потомство одной клетки (обозначается КОЕ – колониеобразующая единица).

Работа этим методом включает три этапа: приготовление разведений, посев на плотную среду в чашках Петри и подсчет выросших колоний.

Приготовление разведений. Для исследования почвы: взвесить 1 г почвы, стерильно поместить в пробирку с 9 мл стерильной воды, закрыть ватно-марлевой пробкой и встряхивать в течение 5 минут для ускорения перехода микроорганизмов из твердой фазы в водную. Затем пробирку на 5 минут поставить в штатив для того, чтобы осадить почвенные частицы.

Численность популяции микроорганизмов обычно достаточно велика. Поэтому для получения изолированных колоний необходимо приготовить ряд последовательных разведений. Разведения готовят в стерильной водопроводной воде или 0,85 %-ном растворе NaCl, используя постоянный коэффициент разведения, чаще всего равный 10. В ходе опыта целесообразно использовать один и тот же коэффициент разведения, так как это уменьшает вероятность ошибки. Для приготовления разведений стерильную водопроводную воду разливают по 9 мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1 мл исследуемой воды (или подготовленной почвенной вытяжки) стерильной пипеткой переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды. Это первое разведение (10^{-1}). Полученное разведение тщательно перемешивают новой стерильной пипеткой, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь.

Важно: каждая стерильная пипетка используется однократно только для перемешивания суспензии в пробирке и переноса из нее отобранного объема. Нельзя одной и той же пипеткой перемешивать суспензию в двух пробирках, так как это приводит к искажению результатов: на наружной стороне пипетки при переносе микроорганизмов всегда остается какое-то их количество, которое нежелательно заносить в другую пробирку.

Степень разведения зависит от плотности исследуемой популяции микроорганизмов; соответственно она тем больше, чем больше плотность популяции (рисунок 20).

Для приготовления каждого разведения следует обязательно использовать новую пипетку. Пренебрежение этим правилом приводит к получению ошибочного результата.

Проведение посева. Высевать суспензию можно поверхностным или глубинным способом. Перед посевом поверхностным способом разливают расплавленную питательную среду в ряд стерильных чашек Петри по 15–20 мл в каждую. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока среда не застынет. После того как среда готова, на ее поверхность стерильной пипеткой наносят точно измеренный объем (0,05 или 0, 1 мл) соответствующего разведения и распределяют его стерильным, стеклянным шпателем по поверхности среды. Высевы на плотную среду проводят, как правило, из трех последних разведений, причем из каждого делают 2–4 параллельных высева. Посевы можно делать одной пипеткой, но при этом начинать следует обязательно с большего разведения.

После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

Подсчет выросших колоний. (производится на следующем занятии)

Колонии бактерий подсчитывают обычно через 3 суток инкубации в термостате при 30 – 37°C.

Подсчет, как правило, проводят, не открывая чашек Петри. Для удобства чернилами или карандашом по стеклу отмечают просчитанную колонию точкой на наружной стороне дна чашки.

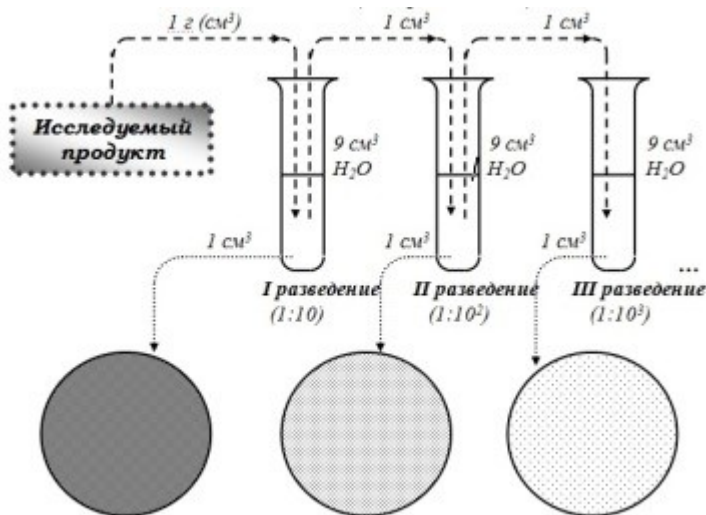


Рисунок 20. Методика серийных разведений (пояснения в тексте)

При большом количестве колоний дно чашки Петри делят на секторы, подсчитывают число колоний в каждом секторе и результаты суммируют. Лучшим разведением следует считать то, при высеве из которого на агаровой пластинке в чашке Петри вырастает от 50 до 100 колоний. Если число выросших колоний оказалось меньше 10, то эти результаты для расчета количества клеток в исходном материале не используют. Результаты параллельных высевов из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний, выросших при высеve из данного разведения на одной чашке.

Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле $M = a \cdot 10^n / V$, где M – количество клеток в 1 мл, a – среднее число колоний при высеve данного разведения, 10 – коэффициент разведения, n – порядковый номер разведения, из которого сделан высев, V – объем суспензии, взятый для посева, в мл.

Комплексный микроскопический анализ колоний. Используя колонии микроорганизмов, выделенных из воздуха, приготовить препараты для определения окраски бактерий по Граму, на наличие спор и капсул, на выявление кислотоустой-

чивости и подвижности, а результаты наблюдения занести в таблицу 4.

Таблица 4

Комплексный анализ колоний

Кол-во колоний	Описание колоний	Морфология	Окраска по Граму	Капсулы	Споры
4	Круглая, 5мм, блестящая, гладкая, плоская, желтая, однородная, плотная с ровным краем	Кокки	Положительная (+)	Есть (+)	Есть (+)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Грицкевич Е. Р. Лабораторный практикум по микробиологии. Минск: ИВЦ Минфина, 2017. 113 с.

Громов Б.В. Поведение бактерий / Б.В. Громов // Соросовский образовательный журнал, 1997. №6. С. 32–28.

Гусев М. В., Минеева Л. А. Микробиология: Учебник для студ. биол. специальностей. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. 464 с.

Еремина И. А., Кригер О. В. Лабораторный практикум по микробиологии: Учебное пособие. Кемерово, 2005. 112 с.

Ленгелер Й., Дреус Г., Шлегель Г. Современная микробиология: прокариоты. В 2-х т. Том 1. – М.: Мир, 2005. 667 с.

Ленгелер Й., Дреус Г., Шлегель Г. Современная микробиология: прокариоты. В 2-х т. Том 2. – М.: Мир, 2005. 510 с.

Лысак В. В., Желдакова Р. А. Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям. Мн.: БГУ, 2002. 97 с.

Нестерова Л. Ю. Цыганов И. В., Ткаченко А. Г. Роль биогенных полиаминов в регуляции скольжения микобактерий / Л. Ю. Нестерова, И. В. Цыганов, А. Г. Ткаченко // Вестник пермского университета. Серия «Биология». 2017. № 3. С. 304–310.

Нетрусов А. И., Егорова М. А. Практикум по микробиологии: Учеб. Пособие для студ. высш. учеб. заведений. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.

Николаев, Ю. А. Плакунов В. К. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. 2007. Т. 76. № 2. С. 149–163.

Пиневич А. В. Микробиология. Биология прокариотов. Учебник в 3-х т. Том 1. – СПб.: Изд-во С.–Петербург. ун.-та, 2006. 352 с.

Пиневич А. В. Микробиология. Биология прокариотов. Учебник в 3-х т. Том 2. - СПб.:Изд-во С.–Петербург. ун.-та, 2007. 331 с.

Прунтова О. В. Курс лекций по общей микробиологии и основам вирусологии. Владимир: Изд-во Владим. гос. ун-та, 2006. 192 с.

Прунтова О. В., Сахно О. Н. Лабораторный практикум по общей микробиологии. Владимир: Изд-во Владим. гос. ун-та, 2005. 76 с.

Теппер Е. З., Шильникова В. К. Практикум по микробиологии. М.: Колос, 1979. 216 с.

Тец В. В. Микробные биопленки и проблемы антибиотикотерапии / В. В. Тец, Г. В. Тец // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. 2013. №4. С. 60–64.

Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. 567 с.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.2.1890-04.

Naves P. et al. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains // Microbial Pathogenesis. 2008. V. 45. № 2. P. 86–91.

O'Toole G. A., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // Molecular Microbiology. 1998. V.30. № 2. P. 295–304.

Учебное издание

**Ушаков Вадим Юрьевич
Нестерова Лариса Юрьевна**

**Микробиология и вирусология.
Лабораторные работы по микробиологии**

Учебное пособие

Редактор *М. А. Шемякина*
Корректор *Н. А. Антонова*
Техническая подготовка материалов: *В. Ю. Ушаков*

Подписано в печать 23.10.2020. Формат 60 x 84/16
Усл. печ. л. 6,05. Тираж 100 экз. Заказ 29

Издательский центр
Пермского государственного
национального исследовательского университета.
614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15

Отпечатано в типографии ПГНИУ.
614990. Пермь, ул. Букирева, 15